TAGESRHYTHMEN UND REGULATION DES AMINO-SÄURETRANSPORTS IN DER RATTENLEBER

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Volker Ehrhardt
aus Herzberg

1976

Göttingen 1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0018

TAGESRHYTHMEN UND REGULATION DES AMINO-SÄURETRANSPORTS IN DER RATTENLEBER

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Volker Ehrhardt
aus Herzberg

Göttingen 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. L. Rensing

Korreferent: Prof. Dr. G. Birukow

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 76

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	
1. Versuchstiere	4
2. Chemikalien	4
3. Präparation und Inkubation der Leberscheiben	4
4. Messung der Radioaktivität	5
5. Berechnung der Ergebnisse	6
6. Aminosäureanalyse	6
Ergebnisse	
1. Tagesrhythmus der Konzentrationen von Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Lysin im Blutplasma der Ratte	8
2. Gesamtgewebewasser der Leberscheiben	1o
3. Extrazellulärer Flüssigkeitsraum	1o
4. Tagesrhythmus und Kinetik der Lysinaufnahme in die Rattenleber	12
5. Tagesrhythmus des AIB- Transports in die Rattenleber	16
6. Einfluß von Cycloheximid auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber	18
7. Einfluß von Cycloheximid auf die AIB- Transportrate in der Rattenleber zur Zeit ihres tagesperiodischen Minimums	2o
8. Einfluß von Cycloheximid auf das Absinken der AIB-	

Transportaktivität nach ihrem tagesperiodischen Maximum 21

9. Einfluß von 5- Azacytidin auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber 23

10. Einfluß von 5- Azacytidin auf den AIB- Transport zur Zeit des tagesperiodischen Minimums und Abhängigkeit der Wirkung von der Proteinsynthese 24

11. Einfluß von α - Amanitin auf den AIB- Transport zur Zeit des tagesperiodischen Minimums und Abhängigkeit der Wirkung von der Proteinsynthese 27

12. Einfluß von Cordycepin (3'- Desoxyadenosin) auf den AIB- Transport in der Rattenleber zu verschiedenen Tageszeiten 29

Diskussion 31

Zusammenfassung 47

Literatur 49

Einleitung

Der zelluläre pool freier Aminosäuren hat eine große Bedeutung im Zellstoffwechsel, sowohl als Bindeglied zwischen Aminosäureaufbau oder - aufnahme und Proteinsynthese, als auch beim Protein- und Aminosäureabbau. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle bei der Regulation des Protein- und Nukleinsäurestoffwechsels. So bedingt Aminosäuremangel in der adulten Rattenleber einen Zerfall der Polysomen zu inaktiven Mono- und Dimeren (1-3) und ein Absinken der Konzentration cytoplasmatischer RNA um mehr als die Hälfte (4). Bei jungen Ratten konnte neben den Veränderungen im RNA- und Polysomengehalt der Leber unter diesen Bedingungen auch eine Verringerung der DNA- Syntheserate festgestellt werden (4,5).

Seit langem ist bekannt, daß viele zelluläre Prozesse in der Rattenleber wie DNA-, RNA- und Proteinsynthese tagesrhythmische Änderungen aufweisen. Da die Konzentrationen freier Aminosäuren in der Rattenleber ebenfalls tagesrhythmisch schwanken (6,7), könnten diese Konzentrationsveränderungen ein wichtiges Element verschiedener circadianer Regelmechanismen darstellen.

Derzeit kann nur schwer abgeschätzt werden, welchen Beitrag der Aminosäure- und der Proteinstoffwechsel, sowie die Permeation von Aminosäuren durch Zellmembranen zu den beobachteten Konzentrationsschwankungen liefern.

Die Einbaurate radioaktiv markierten Tryptophans und Leucins weist einen Tagesrhythmus mit unterschiedlichen Maxima und Minima auf (8-1o). Ob aber eine zu bestimmten Tageszeiten verstärkte Verwendung einzelner Aminosäuren zu einem Tagesrhythmus ihrer Konzentrationen beitragen kann, ist nicht geklärt. Über eine Tagesperiodik des Proteinabbaus in der Rattenleber ist bis heute nichts bekannt.

Enzyme des Aminosäurestoffwechsels wie die Tyrosintransaminase und die Tryptophan- Oxygenase sind hinsichtlich der Tagesperiodizität und der Regulation ihrer Aktivität relativ gut untersucht worden. Es scheint jedoch zweifelhaft, ob eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme die Konzentrationen ihrer Substrate in der Leber beeinflußt (11).

Tageszeitlich unterschiedlicher Transport von Aminosäuren aus dem Blut in die Leber dagegen könnte zu einem Tagesrhythmus ihrer Konzentrationen im zellulären pool wesentlich beitragen, denn die Konzentration freier Aminosäuren in der Leber liegt im allgemeinen weit über den Konzentrationen im Blutplasma (12).

Über solche Tagesrhythmen ist allerdings wenig bekannt. Baril und Potter beobachteten eine tageszeitlich unterschiedliche Akkumulation von Cycloleucin, einer in der Natur nicht vorkommenden Aminosäure, in der Rattenleber in vivo mit einem Maximum zu Beginn der Dunkelphase (13,14). Der Histidin-Transport im Dünndarm der Ratte weist ebenfalls einen Tagesrhythmus auf (15).

Auf welche Weise die beobachteten Tagesrhythmen des Aminosäuretransports kontrolliert werden, ist völlig unbekannt, überhaupt sind Fragen zur Regulation des Aminosäuretransports zur Zeit nur lückenhaft geklärt (16-24).

Es erschien mir aus diesem Grund interessant, näheres über die Tagesperiodizität des Aminosäuretransports und seiner Regulation in der Rattenleber in Erfahrung zu bringen, insbesondere, da man in neuerer Zeit auf die mögliche Bedeutung der Permeabilitätseigenschaften biologischer Membranen für circadiane Rhythmen aufmerksam geworden ist (25,26).

Ich bestimmte zunächst die Konzentrationen der freien Aminosäuren

Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Lysin im Blutplasma der Ratte zu verschiedenen Tageszeiten, um Hinweise auf mögliche Beziehungen zwischen extra- und intrazellulärem pool dieser Aminosäuren zu erlangen. Weiterhin werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit tagesperiodische Schwankungen der Aufnahme von ^{3}H-Lysin und ^{14}C-α- Aminoisobuttersäure (AIB) in den Aminosäure- pool der Leberscheiben von zu verschiedenen Tageszeiten geschlachteten Ratten beschrieben. Um festzustellen, welche Bedeutung Protein- und RNA- Synthese für den Tagesrhythmus des AIB- Transports haben, maß ich die Transportaktivität, nachdem den Ratten verschiedene spezifische Inhibitoren injiziert wurden.

Herrn Prof. L. Rensing möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit danken.

Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere verwendete ich ausschließlich männliche Sprague-Dawley- Ratten eines hauseigenen ingezüchteten Stammes mit einem Gewicht von 250-350g. Jeweils 6-8 Tiere wurden in Drahtkäfigen von 60x 60 cm Grundfläche bei ca. 23°C unter kontrolliertem Licht- Dunkel-Wechsel gehalten (Licht: 6-18h, Dunkel: 18-6h). Die Ratten hatten ad libitum Zugang zu Trinkwasser und Futter (Altromin^{R}).

2. Chemikalien

Die für die Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Riedel de Haen, Merck und Serva und waren sämtlich p.A. oder für biochemische Zwecke. α- Amanitin bezog ich von Boehringer (Mannheim), Cordycepin von Sigma (USA). Cycloheximid, 5-Azacytidin und Cytidin wurden ebenfalls von Serva geliefert. Die von mir benutzten Radiochemikalien, ^{3}H-Inulin, 2-Amino-1-^{14}C-Isobuttersäure und L-(4,5(n)-^{3}H)-Lysinmonohydrochlorid, erhielt ich von der Firma Buchler und Co, Braunschweig.

Bei Untersuchungen zur Abhängigkeit des Aminosäuretransports von RNA-und Proteinsynthese wurden die Inhibitoren in einer Konzentration von 2 mg/0,5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g Körpergewicht (Cycloheximid, 5-Azacytidin, Cytidin und Cordycepin), bzw. 50 µg/ 0,5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g Körpergewicht (α- Amanitin) intraperitoneal injiziert.

3. Präparation und Inkubation der Leberscheiben

Ich tötete die Ratten zu verschiedenen Tageszeiten durch Genickschlag und entfernte ihnen den rechten Leberlappen. Von diesem Stück Leber wurden mit einem Tissue Slicer 5-6 ca. 0,5 mm dicke Scheiben (200-

3oomg) geschnitten und zunächst 15 min in 1oo ml -Erlenmeyerkolben vorinkubiert. Die Kolben enthielten 2o ml eines mit O_2-CO_2 (95:5% v/v) begasten Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Puffers ohne Transportsubstrat. Während der Vorinkubation nehmen die intrazellulären Konzentrationen der freien Aminosäuren stark ab, da sie entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten in das Inkubationsmedium diffundieren. Dadurch kann eine mögliche Beeinflussung des Transports einzelner Aminosäuren durch Gegenstromeffekte oder durch Kompetition um ein gemeinsames Transportsystem bei einer folgenden Inkubation in frischem, die betreffende Aminosäure enthaltenden Puffer weitgehend vermieden werden (27).

Nach der Vorinkubation wurden die Leberscheiben abfiltriert und in Erlenmeyerkolben mit frischem, ebenfalls begasten KRB-Puffer überführt, die 0,25 µCi/ml ^{3}H-Lysin bzw. 0,05 µCi/ml ^{14}C-AIB enthielten. Die Endkonzentration der Aminosäuren betrug 1 mM. Nach 1-stündiger Inkubation bei 38°C wurden die Leberscheiben wiederum abfiltriert, mit eiskaltem KRB-Puffer gewaschen und gewogen.

Für die Bestimmung des extrazellulären Flüssigkeitsraumes wurden die Leberscheiben bis auf eine Veränderung ebenso behandelt. Der Puffer enthielt während der einstündigen Inkubation 0,625 µCi/ml ^{3}H-Inulin, einen extrazellulären Marker. Die Endkonzentration des Inulins betrug 0,4 mg/ml (28).

4. Messung der Radioaktivität

Nach der Inkubation wurden die Leberscheiben mit der 1o-fachen Menge 6%-iger Sulfosalicylsäure (Gew./Vol.) homogenisiert. Zu aliquoten Teilen des die radioaktiven Substanzen enthaltenden KRB-Puffers gab ich ebenfalls das 1o-fache Volumen 6%-iger Sulfosalicylsäure. Me-

dium und Homogenat wurden bei 15.000 x g 2o min lang zentrifugiert. Zu jeweils 0,5 ml der Überstände pipettierte ich 1o ml Bray- Szintillationsflüssigkeit. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Packard- Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tricarb Mod. 332o). Da der mit der "Kanalverhältnismethode" bestimmte Wirkungsgrad in Leberscheibenextrakt und Puffer nicht unterschiedlich war, konnte ich anhand der Impulsrate im Puffer die Konzentration der radioaktiven Aminosäure, bzw. des Inulins im Leberscheibenextrakt direkt berechnen, ohne zuvor die gemessenen cpm in dpm umrechnen zu müssen.

5. Berechnung der Ergebnisse

Die Konzentrationen der in die intrazelluläre Flüssigkeit aufgenommenen Aminosäuren wurden aus den Messungen ihrer Radioaktivität, des extrazellulären Flüssigkeitsraumes und des gesamten Gewebewassers berechnet (29). Das gesamte Gewebewasser bestimmte ich als Gewichtsdifferenz zwischen den Leberscheiben nach der Inkubation und nach 24- stündiger Trocknung in einem Trockenschrank bei 1oo° C.

6. Aminosäureanalyse

Für die Bestimmung der freien Aminosäuren des Blutplasmas schlachtete ich Ratten zu verschiedenen Zeiten des Tages, entfernte ihnen ein Stück des rechten Leberlappens und sammelte das austretende Blut mit einer heparinisierten Injektionsspritze. Die von 4 Ratten gepoolten Blutproben zentrifugierte ich 1o min in einer Tischzentrifuge. Die freien Aminosäuren des Blutplasmas wurden mit 6%- iger Perchlorsäure extrahiert und nach einer von Stegemann beschriebenen Methode, die ich für kleinere Probengrößen modifizierte, getrennt (30,31).

Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Lysin wurden anschließend mit Ninhydrin quantitativ bestimmt.

Die freien Aminosäuren der inkubierten Leberscheiben extrahierte ich ebenfalls mit 6%- iger Perchlorsäure. Ihre Trennung und Quantifizierung erfolgte mit der für die Bestimmung der freien Aminosäuren des Blutplasmas angewandten Methode.

Um festzustellen, in welchem Ausmaß das radioaktive Lysin während der Inkubation der Leberscheiben abgebaut wird, wurden Proben des Leberscheibenextrakts nach 1-stündiger Inkubation der Leberscheiben auf Chromatographierpapier Whatman No.1 aufsteigend mit wassergesättigtem Phenol und Butanol- Eisessig- Wasser (4:1:1) entwickelt. Das Chromatogramm trocknete ich und schnitt es in 1,5x3 cm große Streifen. Diese überführte ich in Szintillationsröhrchen mit 1o ml Bray- Szintillationsflüssigkeit, eluierte sie über Nacht und maß ihre Radioaktivität im Szintillationsspektrometer. In den Leberscheibenextrakten von um 1o.ooh und 2o.ooh geschlachteten Ratten wurden fast 1oo% der Radioaktivität im Lysin gefunden.

Ergebnisse

1. Tagesrhythmus der Konzentrationen von Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Lysin im Blutplasma der Ratte

Die freien Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Lysin erreichen im Blutplasma der Ratte um 14.ooh höhere Konzentrationen als um 6.ooh und um 18.ooh. Während der Nacht steigt die Lysinkonzentration erneut bis zu einem zweiten Maximum um 2.ooh an (Abb.1, 2).

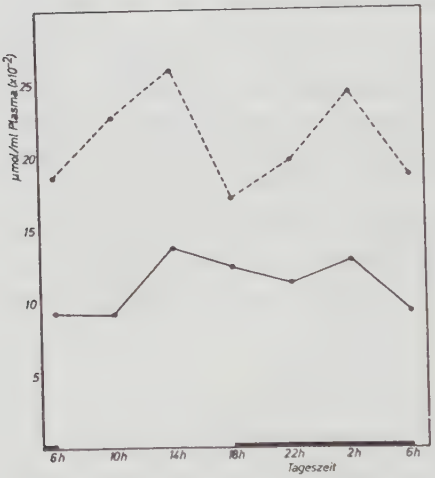

Abb. 1

Tagesrhythmus der Ornithin- und Lysinkonzentration im Blutplasma der Ratte. - - - - Lysin, ——— Ornithin. Die Punkte geben den Mittelvon 3-4 Messungen an, für die jeweils 4 Ratten geschlachtet wurden.

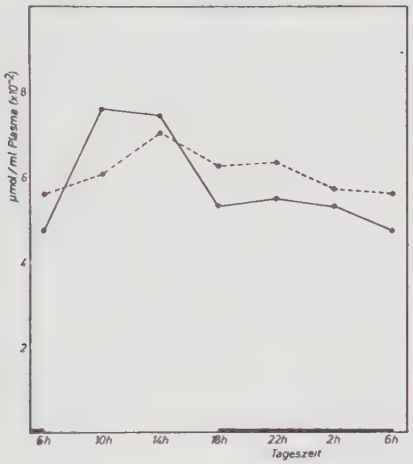

Abb. 2

Tagesrhythmus der Tyrosin- und Phenylalaninkonzentration im Blut-Plasma der Ratte. ——— Tyrosin, - - - - Phenylalanin. Sonst wie Abb.1

Die von mir ermittelten durchschnittlichen Konzentrationen der Aminosäuren im Blutplasma liegen im Bereich der Befunde anderer Autoren (12,32). Während Ornithin und Lysin hinsichtlich der Tagesperiodizität ihrer Konzentrationen im Plasma der Ratte noch nicht untersucht worden sind, sind tagesrhythmische Schwankungen des freien Tyrosins und Phenylalanins bereits bekannt (33). Die von mir beobachteten tageszeitlichen Veränderungen der Tyrosin- und Phenylalaninkonzentration im Blutplasma sind in Übereinstimmung mit diesen Befunden.

2. Gesamtgewebewasser der Leberscheiben

Das Gesamtgewebewasser der Leberscheiben bleibt nach der 15- minütigen Vorinkubation bis zu 2 Stunden konstant und beträgt 73,1 ± 1% des Frischgewichts der inkubierten Leberschnitte (3- facher mittlerer Standardfehler, 8 Messwerte). Diese Zahl stimmt gut mit Angaben in der Literatur überein (27, 35). Einen Tagesrhythmus des Gesamtgewebewassers der Leberscheiben konnte ich nicht beobachten, ebenso wird es durch Injektion der Versuchstiere mit Cycloheximid, α - Amanitin, 5- Azacytidin, Cytidin und Cordycepin wenigstens für die von mir gewählten Behandlungszeiten nicht verändert.

3. Extrazellulärer Flüssigkeitsraum

Für die Bestimmung des extrazellulären Flüssigkeitsraumes wurden zunächst Leberscheiben von unbehandelten Ratten für 2, 5, 1o, 2o, 6o und 12o min mit ^{3}H-Inulin inkubiert. Die Größe des extrazellulären Flüssigkeitsraumes steigt während der ersten 2o min stark an, strebt dann aber nach 1-2 Stunden einem Sättigungswert entgegen (Abb. 3). Einen Tagesrhythmus der Größe des extrazellulären Flüssigkeitsraumes konnte ich nicht feststellen. Der von Harper und Tews an Rattenleberscheiben mit ^{14}C- Inulin bestimmte extrazelluläre Flüssigkeitsraum liegt mit 27,2% nach 15 min, 22,4% nach 3o min, 26,5% nach 6o min und 27,2% des Gesamtgewebewassers nach 75 min Inkubation durchaus im Rahmen meiner Ergebnisse (27). Dagegen fanden Crawhall und Segal mit dem gleichen extrazellulären Marker bei Rattenleberschnitten nach 6o- minütiger Inkubation einen mit 21% des Gesamtgewebewassers deutlich niedrigeren Wert für die Größe des

extrazellulären Flüssigkeitsraumes (34). Dieser Unterschied ist möglicherweise auf ein höheres durchschnittliches Molekulargewicht der von diesen Autoren verwendeten ^{14}C- Inulinchargen zurückzuführen.

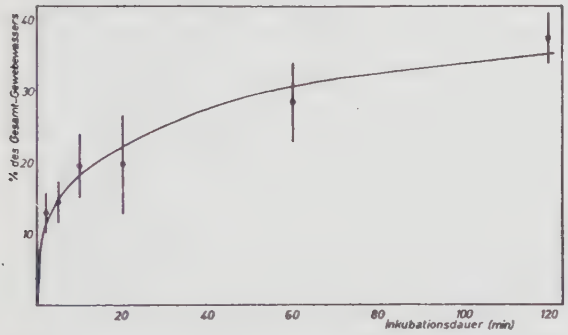

Abb. 3

Größe des extrazellulären Flüssigkeitsraumes in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Leberscheiben. Die einzelnen Punkte stellen das Mittel von 5-12 Messungen dar, die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an.

Nachdem Ratten Cycloheximid injiziert worden ist, vergrößert sich der extrazelluläre Flüssigkeitsraum. Der Einfluß des Cycloheximids ist bereits nach 3- stündiger Behandlungsdauer und 6o- minütiger Inkubation der Leberschnitte mit ^{3}H- Inulin zu beobachten. Nach einer Behandlungszeit von 6 Stunden umfaßt der extrazelluläre

re Flüssigkeitsraum mehr als 4o% des Gesamtgewebewassers nach der von mir gewählten Standardinkubationszeit der Leberscheiben von 1 Stunde (Abb. 4). Es kann nur vermutet werden, worauf das Anschwellen des extrazellulären Flüssigkeitsraumes beruht, zum Beispiel, daß die Leberzellen für größere Moleküle wie Inulin permeabel werden. Auffällig ist, daß die Ratten nach einer Cycloheximid- Injektion unter starkem Durchfall leiden. Gleichzeitig steigt die DNA- Konzentration in den Leberzellen innerhalb von 12 Stunden um mehr als das Doppelte (36). Offensichtlich wird unter dem Einfluß des Antibiotikums die Elektrolytresorption besonders im Darm stark gehemmt und es kommt aus diesem Grund im Lauf der Zeit zu einer starken Entwässerung des gesamten Organismus. Ob die Zellmembranen schon durch diesen Wasserverlust stark geschädigt werden, ist nicht festzustellen. Die Schädigung der Membranen könnte auch erst bei der Inkubation im KRB- Puffer erfolgen, während der die Leberscheiben augenscheinlich wieder Wasser aufnehmen, da sich ihr Gesamtwassergehalt nicht von dem der Leberscheiben unbehandelter Tiere unterscheidet.

Die anderen im Lauf meiner Untersuchungen den Versuchstieren injizierten Pharmaka haben keine Veränderungen der Größe des extrazellulären Flüssigkeitsraumes zur Folge.

4. Tagesrhythmus und Kinetik der Lysinaufnahme in die Rattenleber

Für meine Untersuchungen zum Tagesrhythmus der Lysin- Aufnahme in die Rattenleber schlachtete ich Ratten zu verschiedenen Tageszeiten und inkubierte von ihren Lebern geschnittene Scheiben 1 Stunde mit radioaktiv markiertem Lysin. Die radioaktive Markierung des Lysin-

pools mit ^{3}H- Lysin weist einen signifikanten Tagesrhythmus auf. Nach 18.ooh steigt sie im säurelöslichen Extrakt der Leberzellen innerhalb von 2 Stunden bis zu ihrem Maximum um 2o.ooh an, um dann sofort wieder abzufallen (Abb. 5). Säulenchromatographische Analysen der Konzentrationen der freien Aminosäuren in den Leberscheiben nach einstündiger Inkubation mit 1 mM kaltem Lysin bestätigten meine mit ^{3}H- Lysin gemachten Beobachtungen (1o.ooh: 0,621 µMol Lysin/ml Zellwasser; 2o.ooh: 0,794 µMol Lysin/ml Zellwasser; Mittelwerte von 3, bzw. 4 Messungen). Die Diskrepanz zwischen der berechneten Menge radioaktiv markierten Lysins, die in die Leberscheiben aufgenommen wurde und der säulenchromatographisch bestimmten Lysinkonzentration in den Leberschnitten ist wahrscheinlich auf Verluste während der Extraktion der Aminosäuren und der folgenden Säulenchromatographie zurückzuführen (siehe "Material und Methoden").

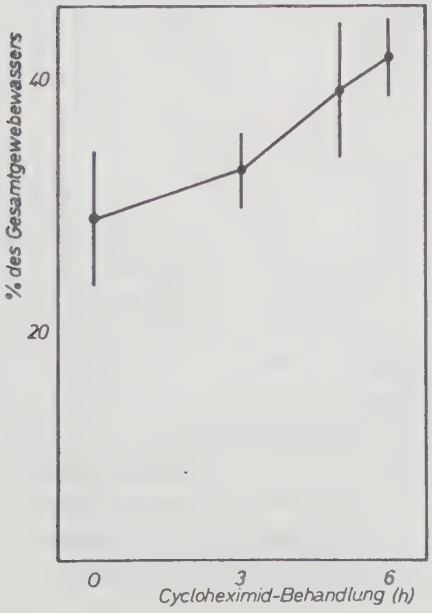

Abb. 4
Größe des extrazellulären Flüssigkeitsraumes in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer der Versuchstiere mit Cycloheximid. Inkubationszeit der Leberscheiben: 1 Stunde. Die einzelnen Punkte sind das Mittel von 6-1o Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an.

Die Konzentration des Lysins in den Leberscheiben übersteigt selbst zur Zeit des Influx- Maximums dieser Aminosäure nicht die Lysinkonzentration im Inkubationspuffer. Aus diesem Grund kann ein aktiver Transportmechanismus beim Influx des Lysins in die Leberzellen höchstens eine geringe Rolle spielen. Um dieses zu prüfen, untersuchte ich zunächst die Abhängigkeit der Lysin- Aufnahme in Rattenleberscheiben von der Zeit, um die initiale Flußrate messen zu können. Der Lysin- Influx in die Leberschnitte steigt während der ersten 1o min steil an, flacht dann ab und strebt nach 1 Stunde einem Sättigungswert entgegen (Abb. 6).

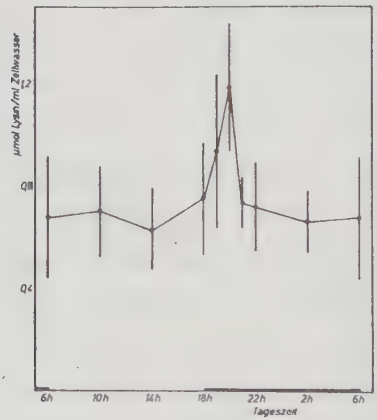

Abb. 5
Tagesrhythmus der Lysin- Aufnahme in den Aminosäure- pool von Rattenleberscheiben. Die einzelnen Punkte sind das Mittel von 6-11 Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an.

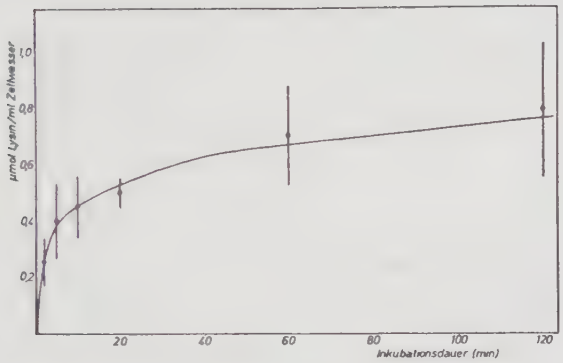

Abb. 6

Kinetik der Lysin- Aufnahme in Rattenleberscheiben. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 1o.ooh. Die einzelnen Punkte sind das Mittel von 6-11 Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an.

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Lysin- Aufnahme von der extrazellulären Lysinkonzentration wählte ich eine 5- minütige Inkubationszeit, da innerhalb dieser Zeit der Lysin- Flux in die Leberzellen noch annähernd linear ist. In einem Konzentrationsbereich von 0,01-5o mM Lysin ließ sich der Lysin- Flux in die Leberschnitte weder bei um 1o.ooh, noch um 2o.ooh geschlachteten Ratten absättigen. Dieses wäre zu erwarten gewesen, wenn aktiver Transport oder wenigstens erleichterte Diffusion an der Aufnahme des Lysins in die Leberzellen beteiligt wären (37). Lysin scheint also

nur passiv entsprechend seinem Konzentrationsgradienten in die Leber zu diffundieren. Die Vermutung, daß aktiver Transport nur eine unbedeutende Rolle beim Lysin- Influx in Rattenleberzellen spielen könnte, ist von anderen Autoren bereits anhand von in- vivo- Experimenten (35) und Untersuchungen an Leberscheiben geäußert worden (38).

Obwohl unter dem Einfluß von Glucagon, wahrscheinlich über cAMP, die Lysinkonzentration in der Rattenleber sowohl in vivo, als auch nach ihrer Perfusion zuzunehmen scheint (39,4o), konnte ich keinen Effekt von dBcAMP auf die Lysin- Aufnahme in Rattenleberscheiben selbst nach einer Inkubation von $2^1/4$ Stunden beobachten.

5. Tagesrhythmus des AIB- Transports in die Rattenleber

Leberscheiben von zu verschiedenen Tageszeiten geschlachteten Ratten wurden 1 Stunde mit ^{14}C- markierter AIB inkubiert. Die anhand der gemessenen Impulsrate im Gewebeextrakt berechnete Transportrate zeigt einen signifikanten Tagesrhythmus (Abb.7). Nach 14.ooh steigt die Transportaktivität stark an und erreicht ihr Maximum um 18.ooh; sie fällt dann während der Nacht wieder bis zu ihrem Minimum gegen Mittag ab. Die nach 1- stündiger Inkubationszeit im Zellwasser erreichte AIB-Konzentration ist zu jeder Tageszeit höher als im Inkubationspuffer. Dieser Befund deutet auf einen aktiven Transportmechanismus hin, der AIB entgegen ihrem Konzentrationsgefälle in die Rattenleber transportiert. Andere Autoren beobachteten nach einer Stunde Inkubationszeit eine mit meinen Ergebnissen vergleichbare Akkumulation dieser Aminosäure in den Leberschnitten. Inkubation der

Leberscheiben mit Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung, bei 0°C oder unter Stickstoffatmosphäre verhinderten eine Anreicherung der Zellen mit AIB, was auf eine wesentliche Bedeutung eines aktiven Transportsystems bei der Akkumulation dieser Aminosäure hinweist (27,34,35,67).

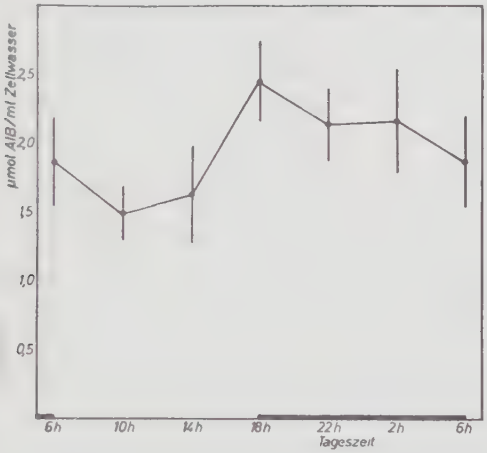

Abb. 7

Tagesrhythmus des AIB- Transports in den Aminosäure- pool von Rattenleberscheiben. Die einzelnen Punkte sind das Mittel von 6-1o Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3-fachen mittleren Standardfehler an.

6. Einfluß von Cycloheximid auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber

Zucker, Ionen und Aminosäuren transportierende Carriersysteme weisen oft eine stark ausgeprägte Substratspezifität und Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Protein- und RNA- Synthese auf. Es wird deshalb heute allgemein angenommen, daß Proteine wesentlicher Bestandteil derartiger Carriersysteme sind.

Besonders empfindlich gegenüber Inhibitoren der Proteinsynthese ist häufig eine durch Hormone induzierte Aktivitätssteigerung eines Aminosäuretransportsystems (16-23). Aus diesem Grud erschien es mir von Bedeutung zu wissen, ob der tagesperiodische Anstieg der AIB- Transportrate auf verstärkter Synthese eines Transportproteins beruht und sich durch einen Proteinsyntheseinhibitor hemmen läßt.

Ich injizierte Ratten um 17.15h, 16.3oh, 15.ooh und 14.3oh 2 mg Cycloheximid/1oog Körpergewicht und schlachtete sie um 18.ooh. In dieser Konzentration hemmt das Antibiotikum bereits nach 45 min die Proteinsynthese in der Rattenleber zu 8o% (41). Die von den Lebern der getöteten Ratten geschnittenen Scheiben inkubierte ich eine Stunde mit ^{14}C- AIB und berechnete die Transportaktivität anhand der Impulsrate im Gewebeextrakt (Siehe "Material und Methoden").

Da die Transportaktivität von Leberschnitten, die von mit physiologischer Kochsalzlösung injizierten Ratten stammten, sich nicht von der Aktivität nicht injizierter Tiere um 18.ooh unterschied, stellte ich diesen Wert als Kontrolle den Transportaktivitäten nach Cycloheximidbehandlung gegenüber.

Wird den Ratten Cycloheximid um 13.3oh und 15.ooh injiziert, so

erreichen die Leberschnitte der um 18.ooh geschlachteten Tiere nicht mehr die Transportaktivität der Kontrollen (Abb. 8). 45 min vor dem Erreichen des tagesperiodischen Maximums injiziertes Cycloheximid hat keinen Einfluß mehr auf den tagesrhythmischen Anstieg der AIB-Transportrate in der Rattenleber. Die Leberscheiben von Ratten, die um 16.3oh mit Cycloheximid injiziert wurden, haben eine Transportaktivität, die sich weder von der Kontrolle, noch von den Werten nach 3-,bzw. nach 4- stündiger Cycloheximidbehandlung signifikant unterscheidet.

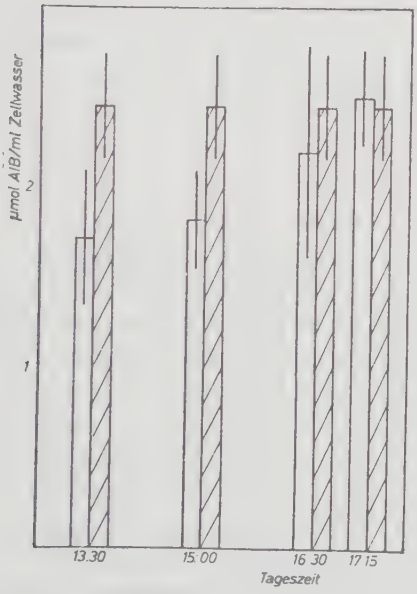

Abb. 8
Einfluß von Cycloheximid auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportaktivität in der Rattenleber. Injektion: 2mg Cycloheximid/ 1oog Körpergewicht zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 18.ooh. Die einzelnen Ergebnisse sind das Mittel aus 6-1o Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an. Helle Säulen: Cycloheximid, schraffierte Säulen: Kontrollen.

7. Einfluß von Cycloheximid auf die AIB- Transportrate in der Rattenleber zur Zeit ihres tagesperiodischen Minimums

Wie schon die Ergebnisse meiner Untersuchungen zum Einfluß von Cycloheximid auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate andeuteten (Abb. 8), scheint Cycloheximid keinen Einfluß auf die basale Transportaktivität zu haben. Deshalb injizierte ich Ratten um 12.ooh 2 mg Cycloheximid/1oo g Körpergewicht und schlachtete sie um 15 h. Innerhalb dieser drei Stunden verändert sich die AIB-Transportaktivität in der Rattenleber nicht signifikant gegenüber den mit physiologischer Kochsalzlösung injizierten Kontrollen. Zu dieser Tageszeit werden anscheinend Transportproteine weder in größerer Menge synthetisiert noch abgebaut (Abb. 9).

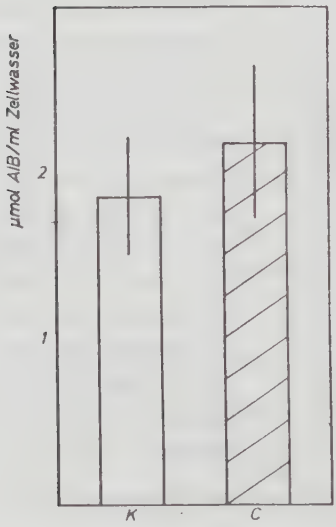

Abb. 9
Einfluß von Cycloheximid auf die AIB- Transportrate in der Rattenleber zur Zeit ihres tagesperiodischen Minimums. Injektion: 2 mg Cycloheximid/1oo g Körpergewicht, bzw. 0,9%- ige NaCl- Lösung um 12.ooh. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 15.ooh. Die Ergebnisse sind das Mittel von 9, bzw. 11 Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an. K: Kontrolle, C: Cycloheximid.

8. Einfluß von Cycloheximid auf das Absinken der AIB- Transportaktivität nach ihrem tagesperiodischen Maximum

Da für den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate offensichtlich Proteinsynthese notwendig ist, interessierte mich, welche Bedeutung diese Synthese für den Abfall der Transportaktivität nach ihrem Maximum um 18.ooh über einen längeren Zeitraum hinweg hat. Zwei Möglichkeiten wären entsprechend meinen Ergebnissen denkbar: Der schnelle Anstieg der Transportaktivität bis zu ihrem tagesperiodischen Maximum und der langsamere Aktivitätsabfall danach könnten durch einen Synthesepuls des hypothetischen Transportproteins bei gleichbleibender Degradationsrate, bzw. Inaktivierung dieses Proteins von der Leberzelle bewerkstelligt werden. Die Verstärkte Neusyn hese des Carrierproteins könnte aber auch für mehrere Stunden andauern. Der Abbau und/oder die Inaktivierung dieses Proteins müßten dann aber wenigstens für einige Zeit nach dem Erreichen des tagesperiodischen Transportmaximums beschleunigt sein.

Um wenigstens einen Hinweis für eine der beiden Möglichkeiten zu erhalten, injizierte ich Ratten um 18.ooh 2 mg Cycloheximid/ 1oog Körpergewicht, bzw. als Kontrolle 0,9%-ige NaCl- Lösung, schlachtete sie 2,4 und 6 Stunden später und inkubierte Scheiben ihrer Lebern eine Stunde mit ^{14}C- AIB.

Zwei Stunden, nachdem den Ratten Cycloheximid injiziert worden ist, ist die AIB-Transportrate in ihrer Leber signifikant niedriger als die der Kontrollen. Innerhalb der nächsten 4 Stunden fällt die Aktivität unter dem Einfluß des Inhibitors kaum noch ab (Abb. 1o).

Auffälligerweise haben die mit physiologischer Kochsalzlösung

injizierten Kontrollen wenigstens um 22.ooh eine signifikant höhere Transportaktivität als nicht injizierte Tiere. Während bei nicht injizierten Tieren die Transportaktivität nach 18.ooh wieder niedriger wird (2o.ooh: 2,193 µMol AIB/ml Zellwasser, Mittel aus 2 Messungen), steigt bei Ratten, denen um 18.ooh 0,9 %- ige Kochsalzlösung injiziert wurde, die Transportaktivität bis 2o.ooh zunächst weiter an, um dann erst abzufallen. Um 24.ooh unterscheidet sich die Kontrolle nicht mehr von den Werten nach 6- stündiger Cycloheximidbehandlung. Eine signifikante Stimulierung des AIB- Transports durch Injektion 0,9 %-iger NaCl- Lösung konnte ich nur zur Zeit nach dem tagesperiodischen Maximum der AIB- Transportaktivität beobachten.

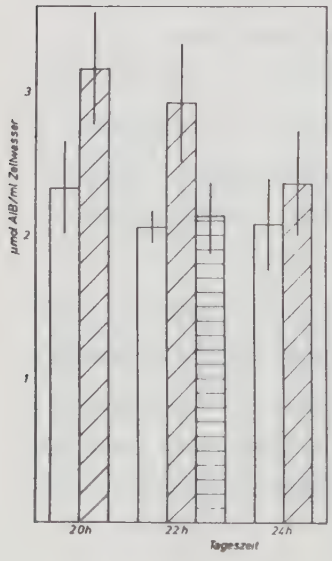

Abb. 1o

Einfluß von Cycloheximid auf das Absinken der AIB- Transportaktivität nach ihrem tagesperiodischen Maximum. Injektion: 2mg Cycloheximid/1oog Körpergewicht, bzw. 0,9 %- ige NaCl- Lösung um 18.ooh. Die Schlachtung der Ratten erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Ergebnisse sind das Mittel von 6-8 Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an. Helle Säulen: Cycloheximid; schräg schraffierte Säulen: Kontrollen; quer schraffierte Säule: nicht injizierte Tiere.

9. Einfluß von 5- Azacytidin auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber

Für meine Experimente zur Abhängigkeit des tagesperiodischen Anstiegs der AIB -Transportrate von der RNA- Synthese benutzte ich anstatt des häufig verwendeten Actinomycin D 5- Azacytidin, da Actinomycin D bei der für Injektionen benutzten Dosis neben der Hemmung der RNA- und Protein- Synthese eine Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen bewirkt, den zellulären ATP- pool erniedrigt und die allgemeine Halblebenszeit polyadenylierter mRNA verkürzt (42,43).

5- Azacytidin wird wahrscheinlich, analog dem 8-Azaguanin, anstatt Cytidin in RNA eingebaut, wodurch es zur Bildung defekter mRNA kommt, die eine veränderte Sekundärstruktur hat (46-48). Für meine Untersuchungen injizierte ich Ratten um 12.ooh, 15.ooh und 17.ooh 2mg 5- Azacytidin/1oog Körpergewicht und schlachtete sie um 18.ooh. Überraschenderweise steigt unter dem Einfluß des Inhibitors die AIB- Transportrate gegenüber den Kontrollen stark an (Abb. 11). Ein erster Effekt von 5-Azacytidin ist bereits nach ein- stündiger Behandlungszeit zu sehen. Die Transportaktivität der Leberscheiben um 12.ooh injizierter Tiere ist um 18.ooh mehr als doppelt so hoch wie die Kontrolle. Nach mehr als 6 Stunden Behandlungszeit scheint die Stimulierung des AIB- Transports unter dem Einfluß von 5- Azacytidin nachzulassen, da die Versuchswerte eine breite Streuung zeigen (2,87o, bzw. 6,042 µMol AIB/ml Zellwasser, Injektion mit 5-Azacytidin um 9.ooh). Möglicherweise ist der Inhibitor nach mehr als 6 Stunden Behandlungszeit wenigstens teilweise verbraucht.

Um sicher zu sein, daß der Effekt des 5- Azacytidins nicht auf

der Wirkung des Nukleosids beruht, injizierte ich Ratten um 12.ooh und um 15.ooh 2 mg Cytidin/1oog Körpergewicht und schlachtete sie um 18.ooh, da nach 3- und 6- stündiger Behandlung der Ratten mit 5- Azacytidin der AIB- Transport signifikant stimuliert wird. Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, ist der AIB- Transport 6 Stunden nach Injektion der Ratten mit Cytidin gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Die Transportaktivität der Leberscheiben nach Behandlung der Versuchstiere mit Cytidin liegt jedoch immer signifikant unter der mit 5- Azacytidin injizierter Tiere.(Abb. 11,12).

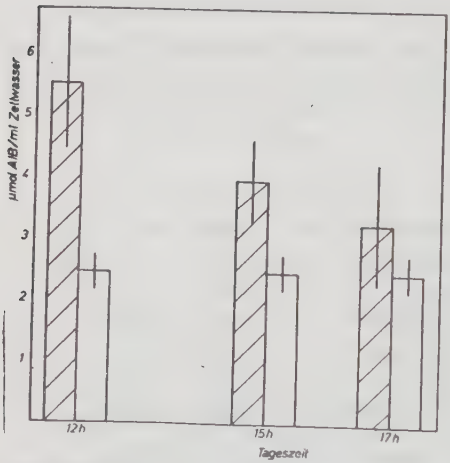

Abb. 11
Einfluß von 5- Azacytidin auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber. Injektion: 2mg 5- Azacytidin/1oog Körpergewicht zu den angegebenen Tageszeiten. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 18.ooh. Offene Säulen: Kontrollen, schraffierte Säulen: 5- Azacytidin. Die Ergebnisse sind das Mittel von 6-1o Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an.

1o. Einfluß von 5- Azacytidin auf den AIB- Transport zur Zeit des tagesperiodischen Minimums und Abhängigkeit der Wirkung von der Proteinsynthese.

Im weiteren untersuchte ich, ob die Stimulierung des AIB- Transports

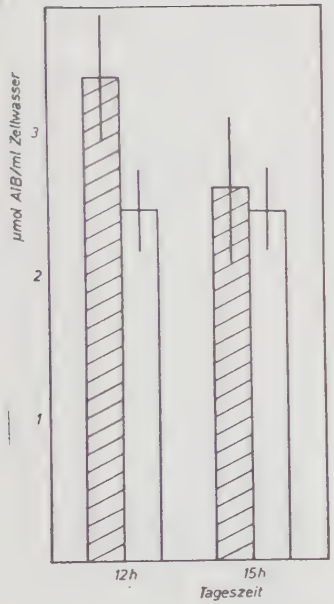

Abb. 12
Einfluß von Cytidin auf den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber. Injektion: 2mg Cytidin/1oog Körpergewicht zu den angegebenen Tageszeiten. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 18.ooh. Offene Säulen: Kontrollen, schraffierte Säulen: Cytidin. Die Ergebnisse sind das Mittel von 7-1o Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3-fachen mittleren Standardfehler an.

durch 5- Azacytidin auf das tagesperiodische Maximum der Aktivität beschränkt ist, oder ob der Inhibitor auch zur Zeit einer niedrigen Transportrate stimulierend wirksam ist. Da am Abend bereits eine 3- stündige Behandlungszeit mit 5- Azacytidin eine signifikante Erhöhung der Transportrate und weiterhin innerhalb dieser Zeit Cytidin keinen Effekt auf den AIB- Transport hat, injizierte ich Ratten um 12.ooh 5- Azacytidin und schlachtete sie um 15.ooh. Im Vergleich zu den mit physiologischer Kochsalzlösung injizierten Kontrollen wird auch zu dieser Tageszeit der AIB- Transport in der Rattenleber durch den Inhibitor signifikant gesteigert. Es war nun für mich von Interesse, ob die Stimulierung der AIB- Transportrate durch 5- Aza-

cytidin ähnlich dem tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate zu hemmen ist. Zur Zeit des tagesperiodischen Maximums der Transportaktivität würden Untersuchungen in dieser Richtung keine eindeutige Aussage erlauben, da neben einer möglichen Hemmung der durch 5- Azacytidin bewirkten Steigerung der Transportrate auch der tagesperiodische Anstieg der Transportaktivität durch Cycloheximid verhindert werden würde. Es wäre nicht zu unterscheiden, ob der tagesperiodische Anstieg der Transportaktivität allein, oder auch ihre 5- Azacytidin- abhängige Stimulierung Proteinsynthese- abhängig wäre. Aus diesem Grund injizierte ich Ratten um 12.ooh gleichzeitig 5- Azacytidin und Cycloheximid und schlachtete sie 3 Stunden später. Ich wählte diese Behandlungsdauer einmal, da nach 3- stündiger Behandlung der Ratten der AIB- Transport in der Leber bereits signifikant durch 5- Azacytidin gesteigert wird, zum andern, um die Nebeneffekte von Cycloheximid auf den Wasserhaushalt der Tiere möglichst gering zu halten.

Drei Stunden nach Injektion der beiden Inhibitoren ist die AIB-Transportrate in der Rattenleber gegenüber nur mit 5- Azacytidin behandelten Tieren signifikant erniedrigt. Der Wert unterscheidet sich nicht von der Kontrolle (Abb. 13). Die Stimulierung des AIB-Transports in der Rattenleber scheint ebenso wie der tagesrhythmische Anstieg der Transportrate von der Proteinsynthese abhängig zu sein.

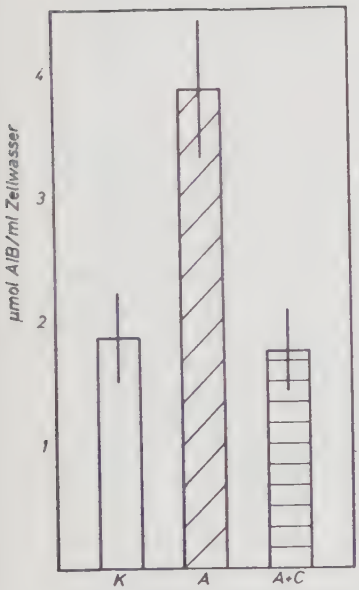

Abb. 13
Einfluß von Cycloheximid auf die Stimulierung des AIB- Transports durch 5- Azacytidin zur Zeit des tagesperiodischen Minimums. Injektion: 2mg 5- Azacytidin, oder 2mg 5- Azacytidin + 2mg Cycloheximid/100g Körpergewicht, oder 0,9 %- ige NaCl- Lösung um 12.00h. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 15.00h. Die Ergebnisse sind das Mittel von 6-9 Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an. K: Kontrolle, A: 5- Azacytidin, A+C: 5- Azacytidin + Cycloheximid.

11. Einfluß von α- Amanitin auf den AIB- Transport zur Zeit des tagesperiodischen Minimums und Abhängigkeit der Wirkung von der Proteinsynthese

Um festzustellen, ob der AIB- Transport in der Rattenleber auch durch andere RNA- Syntheseinhibitoren stimuliert werden kann, oder ob der stimulierende Effekt auf 5- Azacytidin beschränkt ist, untersuchte ich die Wirkung von α- Amanitin auf den AIB- Transport zur Zeit seines Minimums. α- Amanitin bindet spezifisch an die RNA- Polymerase II aus eucaryotischen Zellen und erniedrigt ihre Aktivität. Die extranukleoläre RNA- Polymerase II ist verantwortlich für

die Synthese der späteren mRNA. Die Aktivität der die Vorläufer der rRNA synthetisierenden RNA- Polymerase I, die in den Nukleoli lokalisiert ist, wird durch α- Amanitin dagegen kaum beeinflußt (49,5o).

Um die Wirkungen von 5- Azacytidin und α- Amanitin vergleichen zu können, injizierte ich Ratten α- Amanitin (5o µg/1oog Körpergewicht ebenfalls um 12.ooh und schlachtete sie um 15.ooh. Unter dem Einfluß des Inhibitors wird die AIB- Transportrate in der Leber der Ratten ebenfalls signifikant gesteigert, wenn auch die Stimulierung im Verhältnis zu der durch 5- Azacytidin bewirkten nicht so stark ausgeprägt ist (Abb. 14). Wird Cycloheximid gleichzeitig mit α- Amanitin den Versuchstieren injiziert, so wird die α- Amanitinabhängige Steigerung der AIB- Transportrate gehemmt.

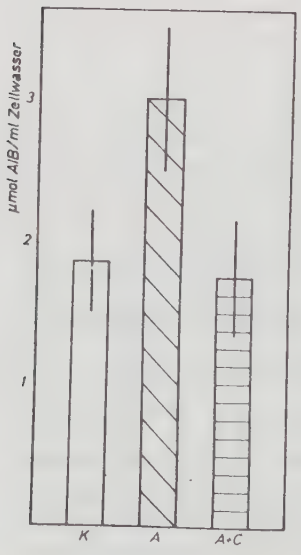

Abb. 14
Einfluß von Cycloheximid auf die Stimulierung des AIB- Transports durch α- Amanitin zur Zeit des tagesperiodischen Minimums. Injektion: 5o µg α- Amanitin, oder 5o µg α- Amanitin + 2 mg Cycloheximid/1oog Körpergewicht, oder 0,9%- igeNaCl- Lösung um 12.ooh. Die Schlachtung der Ratten erfolgte um 15.ooh. Die Ergebnisse sind das Mittel von 6- 9 Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an. K: Kontrolle, A: - Amanitin, A+C: - Amanitin + Cycloheximid.

12. Einfluß von Cordycepin (3'- Desoxyadenosin) auf den AIB- Transport in der Rattenleber zu verschiedenen Tageszeiten.

Ein großer Teil der HnRNA und mRNA eucaryotischer Zellen besitzt mit Ausnahme des Histon- Messengers, der nie polyadenyliert ist, an seinem 3'-OH- Ende ein Ribonuklease- resistentes Segment, das überwiegend aus Adenylsäureresten besteht. Offensichtlich werden diese poly(A)- Stränge posttranscriptional vor allem im Zellkern synthetisiert. Poly(A) scheint eine wichtige Rolle beim Processing von hnRNA zu mRNA und/oder beim Transport des Messengers aus dem Kern ins Cytoplasma zu spielen (53).

Es erschien mir von Bedeutung zu erfahren, ob für den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber ein posttranscriptionales Processing und/oder Transport von mRNA aus dem Kern notwendig sind. Ich injizierte zu diesem Zweck Ratten zunächst um 15.ooh Cordycepin (2mg/1oog Körpergewicht) und schlachtete sie um 18.ooh. Cordycepin wird in der Zelle zum Triphosphat phosphoryliert und in die RNA eingebaut. Während kurzer Inkubationszeiten wird durch diese Substanz die Polyadenylierung im Zellkern gehemmt (51,53). Nach der Cordycepin- Behandlung konnte ich um 18.ooh keine Veränderung der AIB- Transportrate in der Leber gegenüber den Kontrollen feststellen (Abb. 15). Auch auf die basale Transportaktivität in der Rattenleber hat Cordycepin keinen Einfluß. Leberscheiben von um 12.ooh mit dieser Substanz injizierter und 3 Stunden später geschlachteter Ratten weisen keine Abweichung hinsichtlich ihrer Transportaktivität von den Kontrollen auf.

Eine mehr als dreistündige Behandlungszeit der Ratten mit Cordy-

cepin erschien mir wenig zweckmäßig, da diese Verbindung auch in rRNA und tRNA eingebaut wird und zum Kettenabbruch führt. Besonders stark ist hiervon die 45s- Vorläufer- rRNA betroffen (54). Deshalb könnte bei längerer Behandlungsdauer der Ratten mit Cordycepin die Proteinsynthese zunehmend gehemmt werden. Wäre unter diesen Bedingungen die AIB- Transportrate niedriger als die der Kontrollen, könnte nicht entschieden werden, ob dieser Effekt auf verminderten Transport polyadenylierter mRNA zu den Polysomen oder auf allgemeine Hemmung der Proteinsynthese zurückzuführen ist.

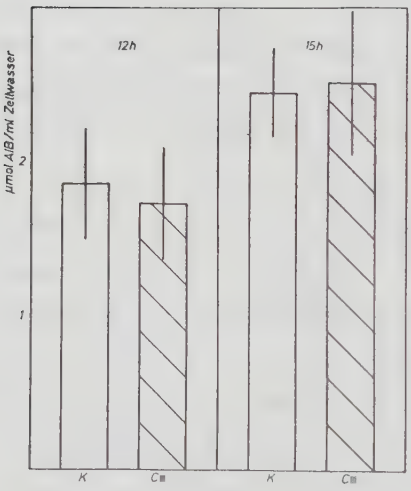

Abb. 15
Einfluß von Cordycepin auf den AIB- Transport in der Rattenleber zu verschiedenen Tageszeiten. Injektion: 2mg Cordycepin/1oog Körpergewicht, bzw. 0,9 %- ige NaCl-Lösung. Die Ergenisse sind das Mittel von 6-1o Messungen. Die senkrechten Striche geben den 3- fachen mittleren Standardfehler an.
A: Injektionen um 12.ooh, Schlachtung der Ratten um 15.ooh. B: Injektionen um 15.ooh, Schlachtung der Ratten um 18.ooh.

Diskussion

Aminosäuren sind aufgrund vielfältiger Beziehungen zum Zellstoffwechsel sehr wichtige Metabolite. Sie müssen, soweit die Zelle sie nicht aus anderen Verbindungen selbst synthetisieren kann, aus dem Extrazellularraum aufgenommen werden. Die Permeationseigenschaften von Aminosäuren durch biologische Membranen sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden, wobei biochemische Aspekte, wie zum Beispiel der Mechanismus der Energieübertragung beim aktiven Transport im Vordergrund standen (56-61). Im Rahmen meiner Arbeit beschäftigte ich mich mit der Tagesperiodik der Aufnahme von Aminosäuren in die Rattenleber und ihrer Abhängigkeit von Protein- und RNA- Synthese, einem mehr dem regulatorischen Bereich zugehörigen Problem des Aminosäuretransports.

Erste Hinweise für die Existenz von Transportmechanismen, die einzelne Aminosäuren aus dem Blut in die Leber transportieren, können sich aus dem Vergleich der Tagesperiodik ihrer Konzentrationen in Blut und Leber ergeben. Wenn die Konzentration einer Aminosäure im Blut abfällt, während ihre Konzentration in der Leber ansteigt, könnte dieses durch ein aktives Transportsystem verursacht werden. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß Tagesrhythmen der Aktivität von Aminosäuren abbauenden Enzymen, sowie Tagesrhythmen des Proteinstoffwechsels die Konzentrationen der freien Aminosäuren sicherlich ebenfalls verändern. Auch die Konzentrationen der freien Aminosäuren im Blut könnten auf verschiedene Weise, wie zum Beispiel durch den Transport aus dem Darm ins Blut der Pfortader oder den Transport aus dem Blut in verschiedene Gewebe des Organis-

mus, tageszeitlich unterschiedlich beeinflußt werden. Dieses wäre auch bei den Aminosäuren, die ich hinsichtlich der Tagesperiodik ihrer Konzentrationen in Leber und Blutplasma der Ratte untersuchte, denkbar; denn ein Vergleich der einzelnen Konzentrationskurven zeigt, daß der Transport aus dem Blut in die Leber wenigstens nicht bei allen untersuchten Aminosäuren allein für die tagesperiodischen Schwankungen ihrer Konzentrationen verantwortlich gemacht werden kann (Abb. 1,2, Ref. 7). Jedoch erscheint die Annahme berechtigt, daß Aminosäuren, deren Konzentrationen in der Leber größer sind als im Blut und die vom Organismus nicht synthetisiert und auch nicht abgebaut werden können, aktiv in die Leber transportiert werden. Wenn die Konzentrationen solcher Aminosäuren, wie zum Beispiel Lysin, zudem in der Leber einen ausgeprägten Tagesrhythmus aufweisen (7), könnte ihr Transport tageszeitlich unterschiedlich sein. Schwankungen der Lysin- Transportrate in die Leber müssen nicht unbedingt entsprechende Veränderungen der Konzentration des freien Lysins im Blut, das die Leber durchströmt, bewirken, da auch die Aufnahme von Lysin und anderen Aminosäuren aus dem Darm deren Konzentrationen in der Pfortader stark beeinflußt (62).

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen, daß der Lysin- pool in den Leberscheiben zwar um 2o.ooh schneller markiert wird, als zu anderen Tageszeiten, jedoch konnte ich selbst zur Zeit der maximalen Aufnahme der radioaktiven Aminosäure in die Leberzellen keine Anzeichen für einen aktiven Transport oder wenigstens erleichterte Diffusion beobachten (Abb. 5,6, siehe auch "Ergebnisse"). Ähnliche Befunde veröffentlichten Crawhall und Davis in einer 1971 erschie-

nenen Arbeit, in der sie die Lysin- Aufnahme in Rattenleberscheiben beschrieben. Die Autoren beobachteten, daß diese Aminosäure wenigstens innerhalb einer 9o- minütigen Inkubationszeit nicht über ihre Konzentration im Inkubationspuffer hinaus in den Leberzellen akkumuliert wird. Nicht berücksichtigt wurde in dieser Arbeit jedoch die Möglichkeit einer Tagesperiodizität des Lysin- Transports, auch untermauerten Crawhall und Davis ihre Befunde nicht durch kinetische Untersuchungen (35). Die Autoren nehmen an, daß Lysin direkt von einem Transportmechanismus in der Membran in Zellproteine eingebaut und dann durch darauffolgende Proteolyse im Cytoplasma freigesetzt wird. Ihre Vermutung basiert einmal auf Ergebnissen von Gan und Jeffay, die zeigen konnten, daß etwa 5o% des freien Lysins der Rattenleber aus dem Proteinabbau stammen (66), zum andern auf eigenen Untersuchungen, denen zufolge nach 9o- minütiger Inkubation 35% des gesamten in die Leber aufgenommenen ^{14}C- Lysins in Proteine inkorporiert werden. Es war den Autoren jedoch nicht möglich, nach Hemmung der Proteinsynthese durch Puromycin eine Anreicherung der freien Aminosäure in den Leberscheiben gegenüber dem Inkubationsmedium zu erreichen (38).

Die Ergebnisse dieser Experimente sprechen für den von Crawhall und Davis vorgeschlagenen Mechanismus der Lysinakkumulation über den Proteinturnover in der Rattenleber, jedoch erscheint mir dann die Beteiligung eines aktiven Transportsystems wenig wahrscheinlich. Da die Halbwertszeit der Aktivität von Aminosäuren transportierenden Systemen bei Tieren nach Hemmung der Proteinsynthese im allge-

meinen wesentlich länger als 1,5 Stunden ist (17, 18, 21, 23, 67-69), wäre nach Puromycinbehandlung der Leberschnitte eine Erhöhung des Isotopenverteilungsverhältnisses zwischen Aminosäure- pool der Leberzellen und Inkubationspuffer zu erwarten gewesen. Denkbar wäre dagegen eine Inkorporation des Lysins in Proteine aus einem mit dem extrazellulären Raum in enger Verbindung stehendem pool, der vielleicht aus Lipo- Aminosäure- Komplexen in den Membranen besteht (75). Diese Möglichkeit der Aufnahme von Aminosäuren aus dem Extrazellularraum in Zellen ist bereits mehrfach beschrieben worden (7o-73). Nach dieser Hypothese könnte sowohl das tagesperiodische Maximum der Lysinkonzentration in der Rattenleber in vivo, als auch die um 2o.ooh erhöhte Markierung des Lysin- pools mit ^{3}H- Lysin in Rattenleberscheiben auf einen erhöhten turnover zellulärer Proteine zurückgeführt werden, wenn man annimmt, daß die Proteine in der Zelle unabhängig von ihrem Alter abgebaut werden (74).

Trotz aller gegenteiligen Befunde ist es jedoch nicht völlig auszuschließen, daß Lysin in vivo durch ein aktives Transportsystem in die Leber aufgenommen wird. Bei einer rein passiven Diffusion müßte Lysin in *vivo*, entsprechend seinem Konzentrationsgradienten, aus der Leber in das Blut diffundieren, d.h. die tagesperiodischen Konzentrationsschwankungen in der Leber und im die Leber durchströmenden Blut müßten ähnlich verlaufen. Dieses ist jedoch nicht der Fall, sondern zur Zeit der geringsten Lysinkonzentration in der Leber weist die Konzentration des freien Lysins im Blutplasma ein Maximum auf (7, Abb. 1).

Auf einen aktiven Lysintransport weisen auch jüngste Beobachtungen von Jefferson und Mitarbeitern hin. Die Autoren berichten

in ihrer Arbeit über die Wirkung von Wachstumshormon auf den Transport und Stoffwechsel von Aminosäuren in perfundierten Rattenlebern. STH bewirkt eine Konzentrationserhöhung des freien Lysins nach 45-minütiger Perfusion in der Leber um etwa das dreifache, während innerhalb des gleichen Zeitraums die Inkorporation von ^{14}C- Valin in Leberproteine nur um etwa 23% gesteigert wird (76). Besonders letztere Beobachtung deutet auf einen aktiven Lysintransport hin, wenn nicht Lysin- reiche Proteine in der Leber existieren, die einem sehr raschen turnover unterworfen sind. Dieses erscheint mir aber wenig wahrscheinlich, da die einzigen bekannten Protein- Spezies, die Lysin in größeren Mengen enthalten, Histone sind. Deren turnover ist jedoch im Verhältnis zu dem mehrerer Leberenzyme sehr gering (74). Für einen aktiven Lysintransport mit einem Maximum am Abend spricht auch die Beobachtung von Crawhall und Davis, daß zwar innerhalb 45 min nach einer wahrscheinlich morgens erfolgten Injektion von ^{14}C- Lysin keine meßbare Akkumulation der radioaktiven Aminosäure in der Rattenleber erfolgt, jedoch 24 Stunden später die Isotopenverteilung zwischen Aminosäure- pool der Leber und dem Blut etwa den Lysinkonzentrationen in beiden Kompartimenten entspricht (38).

In KRB- Puffer inkubierte Leberschnitte sind möglicherweise für eine Untersuchung des Lysintransports ungeeignet, da das System bestimmte Faktoren, wie zum Beispiel Hormone, für seine volle Aktivität benötigen könnte. Um letztlich klären zu können, auf welche Weise Lysin in der Rattenleber akkumuliert wird und wie der Tagesrhythmus seiner Konzentration zustande kommt, müßte die Aufnahme dieser Aminosäure an einem modifizierten System untersucht werden. Gut ge-

eignet wären in dieser Hinsicht Rattenlebern, die mit einem Medium perfundiert werden, das neben Hormonen, wie zum Beispiel Glucocorticoiden, auch Erythrocyten, Serumproteine und energieliefernde Metabolite enthält (39). Anhand des Zeitverlaufs der Markierung in Proteinen und Aminosäure- pool mit radioaktivem Lysin könnte entschieden werden, ob Lysin aktiv in die Zellen transportiert oder ob es ohne Durchlaufen des allgemeinen Aminosäure- pools in Zellproteine eingebaut und anschließend durch Proteolyse ins Cytoplasma der Leberzellen freigesetzt wird (77).

Neben Lysin untersuchte ich AIB hinsichtlich der Tagesperiodizität ihres Transports in Rattenleberscheiben. Die Transportrate dieser in der Natur nicht vorkommenden Aminosäure weist einen signifikanten Tagesrhythmus auf (Abb. 7). Obwohl Cycloleucin wahrscheinlich, ähnlich wie von Ehrlich- Ascites- Zellen auch durch das AIB transportierende System in die Leberzellen aufgenommen wird, konnten Potter und Mitarbeiter bei ad libitum gefütterterten Ratten tageszeitliche Schwankungen des Cycloleucintransports in die Leber in vivo nicht nachweisen (13,14,78). Da Potter und Mitarbeiter für ihre Experimente jeweils nur 3 Ratten zu den verschiedenen Tageszeiten schlachteten und auf dieser Basis naturgemäß statistische Aussagen kaum möglich sind, könnten hierdurch die von meinen Ergebnissen abweichenden Befunde bedingt sein. Zudem erscheinen mir Untersuchungen in vivo zur Tagesperiodik des Aminosäuretransports wenig aussagekräftig zu sein. So wird Cycloleucin wenigstens in Ehrlich- Ascites-Tumorzellen auch durch ein Transportsystem aufgenommen, das sehr starke Austauscheigenschaften hat (78). Unter den wenig kontrollierbaren in- vivo- Bedingungen könnte durch den Einfluß eines Hormons

intrazellulär durch Proteolyse oder Synthese eine natürliche Aminosäure angehäuft werden, die ebenfalls eine Affinität zu dem Cycloleucin transportierenden System hat. Durch "counter transport" könnte dann die nicht metabolisierbare Aminosäure verstärkt in die Leber aufgenommen werden, ohne daß sich die Affinität des Systems zu dieser Aminosäure und die Maximalgeschwindigkeit, mit der sie transportiert werden kann, verändern. Es wäre aber auch denkbar, daß das Cycloleucin transportierende System in der Rattenleber, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Ehrlich- Ascites- Zellen, keine Austauscheigenschaften besitzt. Wenn unter diesen Bedingungen die Konzentrationen der natürlichen Aminosäuren im Blut abnehmen, weil sie in bestimmten Geweben verstärkt zur Proteinsynthese verwendet oder abgebaut werden, so würde aufgrund geringerer Konkurrenz um extrazelluläre Transport- sites ebenfalls eine verstärkte Aufnahme der nicht- metabolisierbaren Aminosäure in die Leber erfolgen, während die kinetischen Eigenschaften des Transportsystems unverändert bleiben.

Welche Faktoren zum Tagesrhythmus des Transports von Aminosäuren in die Leber beitragen können, kann nur vermutet werden. Es ist bekannt, daß einige Hormone den Aminosäuretransport in die Leber stimulieren können. Wachstumshormon, Hydrocortison, Insulin, Adrenalin und Glucagon, letztere wahrscheinlich über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP- Spiegels, erhöhen sowohl in perfundierten Rattenlebern, als auch in Leberschnitten die AIB- Transportrate (2o,39,67,76,79). Tageszeitlich unterschiedliche Konzentrationen dieser Hormone im Blut, wie sie für Glucocorticoide beschrieben

wurden (8o), könnten für den Tagesrhythmus des AIB- Transports in der Rattenleber von Bedeutung sein.

Die Induktion verschiedener Aminosäuretransportsysteme durch Hormone ist auffallend sensitiv gegenüber Inhibitoren der Proteinsynthese (16-23). Ich untersuchte deshalb, ob der tagesperiodische Anstieg der AIB- Transportrate in der Rattenleber, der möglicherweise ebenfalls durch ein Hormon beweirkt wird, durch Cycloheximid gehemmt werden kann.

Der Proteinsyntheseinhibitor verhindert den Anstieg der AIB- Transportrate am Abend, wenn er mehr als 1,5 Stunden vor dem Maximum den Ratten injiziert wird (Abb. 8). 45 min vor der maximalen Transportaktivität injiziertes Cycloheximid hat keine Wirkung mehr auf den AIB- Transport, während eine Cycloheximid- Injektion um 16.3oh starke Schwankungen der Versuchswerte um 18.ooh zur Folge hat. Da Cycloheximid innerhalb kurzer Zeit die Proteinsynthese in der Rattenleber hemmt (41), muß etwa um 16.3oh die Synthese von Transportproteinen einsetzen. In welcher Weise das für den tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate synthetisierte Protein am Transportmechanismus beteiligt ist und ob es sich dabei möglicherweise um mehrere Proteine handelt, ist meinen Versuchsergebnissen nicht zu entnehmen. Die nach Hormonbehandlung erhöhte apparente V_{max} mehrerer Transportsysteme wird allgemein als Neusynthese von Carrierproteinen gedeutet (18,19,21,81,82). Da jedoch beim Transport von Aminosäuren und anderen Substanzen durch biologische Membranen mehrere Reaktionen hintereinander innerhalb der Membran ablaufen müssen (37), an denen mit Sicherheit eine Anzahl von Proteinen be-

teiligt ist, können kinetische Daten der Transportprozesse nur Anhaltspunkte bieten. Die vollständige Isolierung und Charakterisierung der Funktion aller an einem Transportmechanismus beteiligten Proteine liegt derzeit noch weit außerhalb des methodisch Möglichen. Zwar ist ist es gelungen, aus E. coli- Membranen Aminosäuren bindendende Proteine zu isolieren, die in irgendeiner Weise an deren Transport beteiligt sind, jedoch ist ihre Funktion und deren Regulation unbekannt (83-85).

Im Gegensatz zum tagesperiodischen Anstieg der AIB- Transportrate wird der Transport weder zur Zeit nach dem Erreichen seines Maximums noch zur Zeit seines Minimums durch Cycloheximid wesentlich beeinflußt (Abb. 9,1o). Die Halbwertzeit der Transportaktivität ist nach Hemmung der Proteinsynthese wesentlich länger als 6 Stunden. Wenn man annimmt, daß durch Cycloheximid zwar die Synthese, jedoch wesentlich weniger der Abbau von Proteinen gehemmt wird (74), so könnte dieser Befund dafür sprechen, daß zum Erreichen der maximalen AIB- Transportrate die Synthese eines am Transport beteiligten Proteins nur kurzzeitig beschleunigt wird, während Abbau bzw. Inaktivierung des Proteins mit gleichbleibender Geschwindigkeit erfolgen. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, daß auch Proteinabbau bzw. Inaktivierung des Transportproteins durch Cycloheximid gehemmt werden. Das würde bedeuten, daß der turnover der Transportproteine bei intakter Proteinsynthese wesentlich höher ist, als die Transportaktivität nach Hemmung der Proteinsynthese erkennen läßt.

Die Stimulierbarkeit des AIB- Transports durch Injektion der Rat-

ten mit physiologischer Kochsalzlösung um 18.ooh ist wahrscheinlich auf Streß- bedingte Ausschüttung von Hormonen zurückzuführen. Möglicherweise sind die Ratten während der Dunkelzeit empfindlicher gegenüber Störungen. Offensichtlich ist die durch NaCl- Injektion der Versuchstiere bewirkte Stimulierung des AIB- Transports mit der Synthese bestimmter Proteine verbunden, da sie durch Cycloheximid gehemmt werden kann (Abb. 1o). Eine Erhöhung der Transportrate durch Aktivierung des AIB- Transportmechanismus durch die injizierte NaCl- Lösung scheint nicht möglich zu sein, denn einmal entspricht die Na^+- Ionenkonzentration im Rattenserum einer 0,9%- igen Lösung und zum andern ist für die Aktivierung von Na- abhängigen Transportprozessen durch Na^+ keine Proteinsynthese notwendig (55,87).

Die hemmende Wirkung von Actinomycin D auf die hormonale Induktion mehrerer Enzyme ist vielfach beschrieben und dahingehend interpretiert worden, daß für die Stimulierung der Synthese dieser Proteine eine beschleunigte Transcription der entsprechenden Codons auf der DNA in mRNA notwendig ist. Es sind aber auch eine Reihe von Fällen bekannt, in denen RNA- Syntheseinhibitoren die "paradoxe" Eigenschaft haben, die basale oder bereits durch Hormone induzierte Aktivität von Enzymen zu erhöhen (63,64). Diese stimulierende Wirkung der Inhibitoren wird als "Superinduktion" bezeichnet (65).

Der Mechanismus der Superinduktion ist selbst bei dem in dieser Hinsicht am besten untersuchten Enzym, der Tyrosintransaminase (TAT), hypothetisch und umstritten. Basierend auf Beobachtungen an HTC-Zellen, die sich hinsichtlich der Induzierbarkeit der TAT nicht wesentlich von normalen Leberzellen unterscheiden, nehmen Tomkins

und Mitarbeiter die Existenz eines posttranscriptionalen Repressors an. Ihrem Modell zufolge soll die Synthese der TAT durch zwei Gene reguliert werden: Ein Strukturgen für das Enzymprotein und ein regulatorisches Gen. Das regulatorische Gen ist verantwortlich für die Synthese eines Repressors, der entweder eine RNA oder ein Protein sein könnte. Dieser Repressor kann an TAT- spezifische mRNA binden und deren Translation verhindern. Weiterhin soll die Repressor- gebundene mRNA schneller abgebaut werden können als nicht Repressor-gebundene.

Die Induktion der TAT durch Steroide könnte nach dieser Hypothese auf zwei Ebenen wirksam werden. Einmal könnte mehr TAT- Messenger unter dem Einfluß des Hormons synthetisiert werden, zum andern könnte das Hormon aber auch die Wechselwirkungen zwischen mRNA und Repressor vermindern und so die Translation des Messengers, der in diesem Zustand nur langsam abgebaut werden kann, stimulieren. Auch die "paradoxe" Wirkung von Actinomycin D könnte mit dem Repressor erklärt werden: Hohe Dosen Actinomycin D hemmen neben der Bildung TAT- spezifischer mRNA auch die Synthese des Repressors. Dadurch wird die Translation des TAT- Messengers stimuliert und gleichzeitig seine Degradation verlangsamt.

Jedoch kann anhand der Verringerung der Synthese eines Proteins nach Hemmung der RNA- Synthese nicht grundsätzlich auf die Stabilität der diese Proteine codierenden mRNA geschlossen werden; denn RNA- Syntheseinhibitoren können einen Zerfall der Polysomen zu inaktiven Mono- und Dimeren herbeiführen und so die Translation stabiler mRNA hemmen (46,63,88-90).

Inzwischen sind zahlreiche Fälle einer Stimulierung der Aktivität von Enzymen durch RNA- und auch Proteinsyntheseinhibitoren bekannt geworden (87). Deshalb könnte die Synthese wenigstens einiger Proteine auf die beschriebene Weise reguliert werden.

Mit einem dem von Tomkins entsprechenden Modell wären sowohl die Stimulierbarkeit des AIB- Transports durch 5- Azacytidin und α - Amanitin, als auch sein Tagesrhythmus in der Rattenleber zu erklären: Die Translation von mRNA, die ein für den Transport wichtiges Protein codiert, wird durch einen Repressor, eine RNA oder ein Protein, bis auf wenige Stunden des Tages gehemmt. Da das Transportprotein möglicherweise einen relativ geringen turnover hat, worauf die geringe Empfindlichkeit des AIB- Transports gegenüber Cycloheximid sowohl am frühen Nachmittag, als auch zur Zeit nach dem Erreichen des tagesperiodischen Maximums hinweist, könnte die Hemmung durch den Repressor fast vollständig sein. Am späten Nachmittag wird, viellicht durch vermehrte Ausschüttung von Hormonen, der Repressor entweder inaktiviert oder seine Synthese vermindert. Die Folge wäre eine beschleunigte Neusynthese von Transportproteinen in der Leber, die durch Cycloheximid gehemmt werden kann (Abb. 8-10).

Auf einen derartigen Mechanismus der Regulation der Synthese von Transportproteinen weist die Stimulierbarkeit der AIB- Transportrate durch Behandlung der Versuchstiere mit 5- Azacytidin und α - Amanitin hin. Diese Substanzen hemmen die RNA- Synthese, bzw. führen zur Synthese defekter RNA und können dadurch die Wirkung des Repressors aufheben. Die Folge wäre wiederum eine beschleunigte, durch

Cycloheximid hemmbare Translation der Transportprotein- spezifischen mRNA.

Zur Zeit des tagesperiodischen Minimums und zur Zeit des Maximums der AIB- Transportrate erreicht die intrazelluläre AIB- Konzentration in den Leberscheiben unter dem Einfluß von 5- Azacytidin das gleiche Niveau. Vielleicht wird zur Zeit des tagesperiodischen Anstiegs des AIB- Transports der Repressor nur teilweise inaktiviert, bzw. seine Synthese nicht vollkommen gehemmt, während 5- Azacytidin eine vollständige Hemmung des Repressors bewirkt. Mit einer nicht vollständigen Hemmung der Synthese des Repressors könnte auch die Stimulierung des AIB- Transports durch α- Amanitin erklärt werden, die nicht so ausgeprägt ist, wie die durch 5- Azacytidin bewirkte, denn nach 3 Stunden hat die Inhibition der RNA- Synthese durch α- Amanitin in der Rattenleber bereits stark nachgelassen (5o). Die gesteigerte AIB- Transportrate in Leberschnitten von Ratten, die mit Cytidin injiziert wurden, ist ohne nähere Untersuchungen nicht zu erklären. Dieses erschien mir jedoch nicht notwendig, da bereits nach 3- stündiger Behandlungszeit der Versuchstiere mit 5- Azacytidin die Transportrate deutlich gesteigert wird, der stimulierende Effekt des Cytidins jedoch erst nach 6 Stunden signifikant ist (Abb. 12).

Die Unempfindlichkeit des AIB- Transports gegenüber einer 3- stündigen Cordycepin- Behandlung der Versuchstiere deutet ebenfalls an, daß der AIB- Transport in der Rattenleber möglicherweise durch einen translationalen Repressor reguliert wird (Abb. 15). Wenn die mRNA, die Transportproteine codiert, polyadenyliert wäre, würde diese Beobachtung bedeuten, daß wenigstens ein für 3 Stunden

verminderter Transport spezifischer mRNA aus dem Zellkern weder die basale Transportaktivität noch ihren tagesperiodischen Anstieg beeinflußt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Insensitivität besonders des tagesperiodischen Maximums der Transportrate gegenüber Cordycepin darauf beruht, daß die mRNA, die Transportproteine codiert, im Cytoplasma polyadenyliert wird, denn die die cytoplasmatische Polyadenylierung von mRNA kann durch Cordycepin nicht gehemmt werden (91-93). Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die Transportprotein- mRNA kein Poly(A)- Segment an ihrem 3'-OH- Ende trägt, denn wenigstens in Seeigelembryonen konnte die Existenz nicht polyadenylierter nicht- Histon- mRNA nachgewiesen werden (94). Eine eventuelle Abhängigkeit des AIB- Transports von Processing und Transport von mRNA aus dem Zellkern wäre in beiden Fällen nicht zu erkennen.

Im Lauf der Zeit ist das von Tomkins entwickelte Modell der posttranscriptionalen Regulation der Synthese bestimmter Proteine insbesondere von der Arbeitsgruppe um Kenney des öfteren kritisiert worden. Diese Autoren beschäftigen sich ebenfalls intensiv mit der Induktion der Tyrosintransaminase durch Glucocorticoide in HTC-Zellen. Sie konnten jedoch, im Gegensatz zu Tomkins und seinen Mitarbeitern, keine Stimulierung oder Aufrechterhaltung der Synthese, sondern eine Hemmung der Degradation der TAT durch Actinomycin D beobachten (63,95). Ob dieser offene Widerspruch zu den Befunden von Tomkins auf methodische Ursachen oder auf die von beiden Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedlichen Zellinien zurückzuführen ist, bleibt offen.

Da die Induktion der TAT in HTC- Zellen durch Cordycepin gehemmt

werden kann und gleichzeitig das Auftreten polyadenylierter mRNA in der Polysomenfraktion um 80% vermindert wird, sind Kenney und Mitarbeiter der Ansicht, daß die Induktion dieses Enzyms durch Steroide allein auf die induzierte Synthese spezifischer mRNA zurückzuführen ist (95).

Jüngere Untersuchungen an der Tryptophanoxygenase in der Rattenleber zeigten, daß die Induktion die Induktion dieses Enzyms durch Glucocorticoide auf der Neusynthese von Tryptophanoxygenase- Messenger beruht. Superinduktion der Aktivität des Enzyms durch Actinomycin D hat keinen Einfluß auf die Konzentration der dieses Protein codierenden mRNA. Eine Regulation der Tryptophanoxygenase durch einen posttranscriptionalen Repressor scheint damit ausgeschlossen, da eine wesentliche Bedingung für die Funktion des von Tomkins postulierten Repressor- Modells eine verlangsamte Degradation der nicht an den Repressor gebundenen Protein- spezifischen mRNA ist (96).

Auch die Progesteron- induzierte Synthese von Ovalbumin im Hühnerovidukt scheint nicht durch einen Repressor auf posttranscriptionaler Ebene reguliert zu werden, da durch Actinomycin D zwar die induzierte Synthese des Proteins weiter gesteigert werden kann, die Konzentration der Ovalbumin- mRNA jedoch nicht größer wird, wie nach dem Repressor- Modell zu erwarten gewesen wäre (97).

Entsprechend den Vorstellungen von Kenney und Mitarbeitern könnte auch die Stimulation der AIB- Transportaktivität durch 5- Azacytidin und α - Amanitin auf eine Hemmung des Abbaus eines transportlimitierenden Proteins zurückzuführen sein. Das aber würde wiederum

bedeuten, daß Cycloheximid, vielleicht durch Hemmung der Synthese von Proteasen, die Degradation der betreffenden Proteine vermindert.

Eine Entscheidung, ob ein posttranscriptionaler Repressor bei der Regulation der Synthese der TAT und anderer Proteine eine Rolle spielt, oder ob die Verhältnisse mehr den Befunden von Kenney und Mitarbeitern entsprechen, wird erst dann von Fall zu Fall getroffen werden können, wenn es gelingt Protein- spezifische mRNA zu isolieren und quantitativ zu bestimmen. Aus diesem Grund ist man auch bei der Interpretation meiner Beobachtungen hinsichtlich des Tagesrhythmus des AIB- Transports und der Beeinflußbarkeit der Transportrate durch Protein- und RNA- Syntheseinhibitoren auf Hypothesen angewiesen. Um genaue Aussagen machen zu können, müßten zunächst am AIB- Transport in der Rattenleber beteiligte Proteine isoliert und quantifiziert werden. Dieses erscheint jedoch zur Zeit, ebenso wie die Isolierung der diese Proteine codierenden mRNA, aus methodischen Gründen nicht möglich zu sein.

Zusammenfassung

1. Die Konzentrationen der freien Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Lysin weisen im Blutplasma der Ratte einen Tagesrhythmus auf. Die Konzentrationen dieser Aminosäuren sind um 14.ooh höher als um 6.ooh und 18.ooh. Lysin erreicht um 2.ooh ein zweites Maximum seiner Konzentration.

2. Die radioaktive Markierung des Aminosäure- pools in Rattenleberschnitten mit ^{3}H- Lysin weist signifikante tagesperiodische Schwankungen mit einem Maximum um 2o.ooh auf. Unter den Versuchsbedingungen ist das Isotopenverteilungsverhältnis zwischen Aminosäure- pool und Inkubationsmedium zu keiner Tageszeit größer als eins. Auch Untersuchungen zur Kinetik des Lysin- Influx in die Leberzellen zeigten, daß Lysin weder aktiv transportiert, noch durch Austauschdiffusion in die Leberscheiben aufgenommen wird, sondern passiv durch die Membranen diffundiert. Die Beziehungen Aminosäure- pool der Leber und Proteinstoffwechsel werden diskutiert.

3. AIB wird in Leberscheiben tageszeitlich unterschiedlich stark akkumuliert. Die maximale Transportrate ist um 18.ooh, die geringste am Nachmittag zu beobachten.

4. Der tagesperiodische Anstieg der Transportrate kann durch Injektion der Versuchstiere mit Cycloheximid gehemmt werden.

5. 5- Azacytidin und α - Amanitin bewirken sowohl zur Zeit einer geringen AIB- Transportrate, als auch während des Transportmaximums eine Stimulierung der Aktivität, die durch Cycloheximid gehemmt werden kann.

6. Cordycepin beeinflußt den AIB- Transport weder um 15.ooh noch um 18.ooh.

7. Die Möglichkeit einer Regulation des Tagesrhythmus des AIB- Transports in der Rattenleber durch einen posttranscriptionalen Repressor wird diskutiert.

Literatur

1. S.Jefferson, A.Korner: Influence of amino acid supply on ribosomes and protein synthesis of perfused rat liver.
Biochemical Journal 111, 703-712 (1969)

2. H.N.Munro: Role of amino acid supply in regulating ribosome function.
Federation Proceedings 27, 1231-1237 (1968)

3. R.W.Wannemacher jr., C.F.Wannemacher, M.B.Yatvin: Amino acid regulation of synthesis of ribonucleic acid and protein in the liver of the rat.
Biochemical Journal 124, 385-392 (1971)

4. R.W.Wannemacher, W.K.Cooper, M.B.Yatvin: The regulations of protein synthesis in the liver of the rats. Mechanisms of dietary amino acid control in the immature animal.
Biochemical Journal 107, 615-623 (1968)

5. A.Mariani, P.A.Migliaccio, M.A.Spadoni, M.Ticca: Amino acid activation in the liver of growing rats maintained with normal and with protein deficient diets.
Journal of Nutrition 90, 25-30 (1966)

6. R.J.Wurtman, W.J.Shoemaker, F.Larin: Mechanism of the daily rhythm in hepatic tyrosine transaminase activity: role of dietary tryptophan.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 59, 800-807 (1968)

7. V.Ehrhardt, L.Rensing: Circadian rhythm changes of amino acid concentrations in rat liver.
International Journal of Chronobiology 2, 367-371 (1974)

8. J.Beckmann: Die tagesrhythmische Synthese der sauren Kernproteine in der Leber adulter Ratten .Unveröffentlicht (1972)

9. A.V.Lebouton, S.D.Handler: Diurnal incorporation of H3-leucine into liver protein.
FEBS Letters 1o, 78-8o (197o)

1o. A.V.Lebouton, S.D.Handler: Persistent circadian rhythmicity of protein synthesis in the liver of starved rats.
Experientia 27, 1o31-1o32 (1971)

11. R.W.Fuller: Rhythmic changes in enzyme activity and their control. In: Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems. M.Rechzigl (Ed.), S.Karger, Basel-München- Paris-London-New York-Sydney (1971) pp. 311-338

12. W.De Loecker, M.L.Stas: Effect of cortisol treatment on free amino acid levels in rats.
Journal of Endocrinology 59, 57-63 (1973)

13. E.F.Baril, V.R.Potter: Systemic oscillations of amino acid transport in liver from rats adapted to controlled feeding schedules.
Journal of Nutrition 95, 228-237 (1968)

14. M.Watanabe, E.F.Baril: Oscillations in tyrosine transaminase activity and amino acid transport in liver of rats adapted to twenty- four or forty- eight hour cycles of feeding and fasting.
Journal of Cell Biology 35, 139a (1967)

15. S.Furuja, Y.Yugari: Daily rhythmic change in the transport of histidine by everted sacs of small intestine.
Biochimica et Biophysica Acta 241, 245-248 (1971)

16. W.L.Risser, T.D.Gelehrter: Hormonal modulation of amino acid transport in rat hepatoma cells in tissue culture.
Journal of Biological Chemistry 248, 1248-1254 (1973)

17. I.W.Weiss, K.Morgan, J.M.Phang: Cyclic adenosine monophosphate - stimulated transport of amino acids in kidney cortex.
Journal of Biological Chemistry 247, 760-764 (1972)

18. T.J.Hahn, S.J.Downing, J.M.Phang: Insulin effect on amino acid transport in bone: dependence on protein synthesis and Na^+.
American Journal of Physiology 220, 1717-1723 (1971)

19. J.M.Phang, S.J.Downing: Amino acid transport in bone: stimulation by cyclic AMP.
American Journal of Physiology 224, 191-196 (1973)

20. J.W.Chambers, R.H.Georg, A.D.Bass: Effect of hydrocortisone and insulin on uptake of α- aminoisobutyric acid by isolated perfused rat liver.
Molecular Pharmacology 1, 66-76 (1965)

21. T.Mohri, H.Kitagawa, T.R.Riggs: Action of insulin on amino acid uptake by the immature rat uterus in vitro.
Biochimica et Biophysica Acta 363, 249-260 (1974)

22. A.Schwartz: Hormonal regulation of amino acid accumulation in human fetal liver explants. Effects of dibutyryl cyclic AMP, glucagon and insulin.
Biochimica et Biophysica Acta 362, 276-289 (1974)

23. R.Roskoski jr., D.F.Steiner: Cycloheximide and actinomycin D inhibition of estrogen- stimulated sugar and amino acid trans-

port in rat uterus.

Biochimica Biophysica Acta 135, 347-349 (1967)

24. R.Franchi- Gazzola, G.C.Gazzola, P.Ronchi, V.Saibene, G.G. Guidotti: Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. II. Adaptive control sites for the "A mediation".

Biochimica et Biophysica Acta 291, 545-556 (1973)

25. D.Njus, F.M.Sulzman, J.W.Hastings: Membrane modell for the circadian clock.

Nature 248, 116-120 (1974)

26. B.I.H.Scott, H.F.Gulline: Membrane changes in a circadian system.

Nature 254, 69-70 (1975)

27. J.K.Tews, A.E.Harper: Transport of nonmetabolisable amino acids in rat liver slices.

Biochimica et Biophysica Acta 183, 601-610 (1969)

28. S.R.Cohen, P.F.Stample, A.Lajtha: The temperature- dependent compartimentation of the extracellular space in mouse brain slices as revealed by the markers: inulin, sucrose, D- mannitol, D- sorbitol and sulfate.

Brain Research 21, 419-434 (1970)

29. M.Genel, C.F.Rea, S.Segal: Transport of sugars and amino acids in mammalian kidney.

Biochimica et Biophysica Acta 241, 779-788 (1971)

30. A.Saifers: Comparative study of various extraction methods for the quantitative determination of free amino acids from brain tissue.

Analytical Biochemistry 40, 412-423 (1971)

31. H.Stegemann: Die Gesetzmäßigkeit der Aminosäuretrennung an Austauschersäulen bei kontinuierlicher Elution.
Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 319, 87-101 (1960)

32. D.L.Bloxam: Nutritional aspects of amino acid metabolism (II). The effects of starvation on hepatic- venous differences in plasma amino acid concentration in the rat.
British Journal of Nutrition 27, 233-247 (1972)

33. J.D.Fernstrom, F.Larin, R.J.Wurtman: Daily variations in the concentrations of individual amino acids in rat plasma.
Life Sciences 10, part I, 813-819 (1971)

34. J.C.Crawhall, S.Segal: Transport of some amino acids and sugars in rat liver slices.
Biochimica et Biophysica Acta 163, 163-170 (1968)

35. J.C.Crawhall, M.G.Davis: Further studies of the transport of amino acids in rat liver slices.
Biochimica et Biophysica Acta 225, 326-334 (1971)

36. J.Beckmann, persönliche Mitteilung.

37. K.Ring: Einige Aspekte des aktiven Aminosäuretransports.
Zeitschrift für angewandte Chemie 82, 343-355 (1970)

38. J.C.Crawhall, M.C.Davis: Uptake of amino acids by rat liver.
Clinical Sciences 37, 565-566 (1969)

39. L.E.Mallette, J.H.Exton, C.R.Park: Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver.
Journal of Biological Chemistry 244, 5724-5728 (1969)

40. L.C.Burns, S.K.Megal, R.E.Koeppe: The effect of fasting and several hyperglycemic agents on the free amino acids of rat liver.
Life Sciences 9, part II, 1045-1051 (1970)

41. R.Döring: Circadian rhythm of RNA synthesis in rat liver: effects of protein synthesis- inhibiting antibiotics at different times of day.
International Journal of Biochemistry 5, 275-285 (1974)

42. R.J.Schwartz: Control of glutamin synthetase synthesis in the embryonic chick neural retina. A caution in the use of actinomycin D.
Journal of Biological Chemistry 248, 6426-6435 (1973)

43. R.H.Singer,S.Penman: Stability of HeLa cell mRNA in actinomycin.
Nature 240, 100-102 (1972)

44. S.Penman, E.Goldstein, M.Reichman, R.Singer: The relation of protein synthesis regulation and RNA metabolism.
Acta Endocrinologica Supplementum 180, 168-191 (1973)

45. R.H.Singer, S.Penman: Messenger RNA in HeLa cells: kinetics of formation and decay.
Journal of Molecular Biology 78, 321-334 (1973)

46. S.W.Kwan, T.E.Webb: A study of the mechanism of polyribosome breakdown induced in regenerating liver by 8- Azaguanine.
Journal of Biological Chemistry 242, 5542-5548 (1967)

47. E.F.Zimmermann: Azaguanine inhibition of protein synthesis. III Site of action in HeLa cells.
Biochimica et Biophysica Acta 157, 378-391 (1968)

48. J.W.Weiss, H.C.Pitot: Effects of 5- Azacytidine on nucleolar

RNA and the perinucleolar particles in Novikoff Hepatoma Cells.
Biochemistry 14, 316-326 (1975)

49. L.Fiume, Th.Wieland: Amanitins, chemistry and action.
FEBS Letters 8, 1-5 (1970)

50. S.T.Jacob, E.M.Sajdel, R.N.Munro: Different responses of soluble whole nuclear RNA polymerase and soluble nucleolar polymerase to different divalent cations and to inhibition by α - Amanitin.
Biochemical and Biophysical Research Communications 38, 765-770 (1970)

51. J.E.Darnell, W.R.Jelllinek, G.R.Molloy: Biogenesis of mRNA: genetic regulation in mammalian cells.
Science 181, 1215-1221 (1973)

52. J.Mendecki, S.Y.Lee, G.Brawerman: Charakteristics of the polyadenylic acid segment associated with messenger ribonucleic acid in mouse sarcoma 180 ascites cells.
Biochemistry 11, 792-798 (1972)

53. J.E.Darnell, L.Philippson, R.Wall, M.Adesnik: Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA.
Science 174, 507-510 (1971)

54. M.Siev, R.Weinberg, S.Penman: The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin.
Journal of Cell Biology 41, 510-520 (1969)

55. S.G.Schultz, A.C.Curran: Coupled transport of sodium and organic solutes.
Physiological Reviews 50, 637-718 (1970)

56. H.N.Christensen, M.E.Handlogten: a cycle of deprotonation and reprotonation energizing amino acid transport?
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 72, 23-27 (1975)

57. J.A.Schafer: An examination of the energetic adequacy of the ion gradient hypothesis for nonelectrolyte transport. In: Na-linked transport of organic solutes. E.Heinz (Ed.) Springer- Verlag Heidelberg, New York (1972) pp. 68-83

58. R.M.Johnstone: Transport of amino acids in Ehrlich Ascites Cells and mouse pancreas. In: Na- linked transport of organic solutes. E.Heinz (Ed.) Springer- Verlag Heidelberg, New York (1972) pp. 51-67

59. H.Hirata, K.Ahlendorf, F.M.Harold: Role of an electrical potential in the coupling of metabolic energy to active transport by membrane vesicles of Escherichia coli.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 7o, 1804-1808 (1973)

6o. A.E.Berger: Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in Escherichia coli.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 7o, 1514-1518 (1973)

61. M.Morville, M.Reid, A.Eddy: Amino acid absorption by mouse Ascites Tumor Cells depleted of both endogenous amino acids and adenosine triphosphate.
Biochemical Journal 134, 11-26 (1972)

62. D.H.Elwyn: Modifications of plasma amino acid patterns by the liver. In: Protein nutrition and free amino acid patterns. J.H.Leathem (Ed.) Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey (1968) pp. 88–106

63. F.T.Kenney: Hormonal regulation of synthesis of liver enzymes. In: Mammalian protein metabolism. Vol. IV, H.N.Munro (Ed.) Academic Press, New York, London (1970) pp. 131–176

64. T.D.Gelehrter: Regulatory mechanisms of enzyme synthesis: enzyme induction. In: Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems. S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney (1971) pp. 165–199

65. E.B.Thompson, D.K.Granner, G.M.Tomkins: Superinduction of tyrosine aminotransferase by actinomycin D in rat hepatoma (HTC) cells.
Journal of Molecular Biology 54, 159–175 (1970)

66. J.C.Gan, H.Jeffay: The kinetics of transfer of plasma amino acids to tissues, and the turnover rates of liver and muscle proteins. The use of continuous infusion technique.
Biochimica et Biophysica Acta 252, 125–135 (1971)

67. J.K.Tews, N.A.Woodcock, A.E.Harper: Stimulation of amino acid transport in rat liver slices by epinephrine, glucagon, and adenosine 3', 5'- monophosphate.
Journal of Biological Chemistry 245, 3026–3023 (1970)

68. L.J.Elsas, L.E.Rosenberg: Inhibition of amino acid transport in rat kidney cortex by puromycin.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 57, 371–378 (1967)

69. D.T.Baron, W.A.Peck, P.A.Frengley, M.A.Lichtman: Cortisol- induced inhibition of amino acid transport in thymic lymphocytes: kinetic parameters, relation to ATP levels and protein synthesis, and specificity.
Biochimica et Biophysica Acta 307, 627-639 (1973)

70. W.J.Van Venroij, C.Poort, M.F.Kramer, M.T.Jansen: Relationship between extracellular amino acids and protein synthesis in vitro and in rat pancreas.
European Journal of Biochemistry 30, 427-433 (1974)

71. W.J.Van Venroij, H.Moonen, L.Van Loon- Klaassen: Source of amino acids used for protein synthesis in HeLa cells.
European Journal of Biochemistry 30, 297-304 (1974)

72. K.Winkler: Kinetics of the flow of amino acids from the extracellular space and the intracellular pools resulting in protein synthesis.
Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 353, 782-786 (1972)

73. J.Airhart, A.Vidrich, E.A.Khairalla: Compartimentation of free amino acids for protein synthesis in rat liver.
Biochemical Journal 140, 539-548 (1974)

74. R.T.Schimke: Regulation of protein degradation in mammalian tissues. In: Mammalian protein metabolism, Vol. IV. H.N.Munro (Ed.). Academic Press, New York, London (1970) pp. 177-228

75. R.W.Hendler: A model for protein synthesis.
Nature 193, 821-823 (1962)

76. L.S.Jefferson, C.M.Schworer, E.D.Tolman: Growth hormone stimu-

lation of amino acid transport and utilization by the perfused rat liver.

Journal of Biological Chemistry 25o, 197-2o4 (1975)

77. H.Aurich: Die Rolle des Aminosäure- pools bei der Regulation des Protein- und Nukleinsäurestoffwechsels.

Wissenschaftliche Zeitschrift der Karl- Marx- Universität Leipzig 17, 727-738 (1968)

78. H.N.Christensen: Some special kinetic problems of transport.

Advances in Enzymology 32, 1-2o (1969)

79. R.W.Chambers, R.H.Georg, A.D.Bass: Effect of glucagon, cyclic 3'-,5'- adenosine monophosphate and its dibutyryl derivative on amino acid uptake by the isolated perfused rat liver.

Endocrinology 87, 366-37o (197o)

8o. G.Hardeland, L.Rensing, R.Hardeland: Circadiane Rhythmen von Hormonen bei der Ratte.

Journal of Interdisciplinary Cycle Research 2, 29-54 (1971)

81. G.G.Guidotti, A.F.Borghetti, B.Lüneburg, G.C.Gazzola: Kinetic analysis of insulin action on amino acid uptake by isolated chick embryo heart cells.

Biochemical Journal 122, 4o9-414 (1971)

82. K.L.Manchester, G.G.Guidotti, A.F.Borghetti, B.Lüneburg: Evaluation of kinetic parameters for uptake of amino acids by cells: effect of insulin on the accumulation of aminoisobutyrate and cycloleucine by isolated rat diaphragm muscle and chick embryo hearts.

Biochimica et Biophysica Acta 241, 226-241 (197o)

83. Y.Anraku: Studies on amino acid binding proteins of Escherichia coli.
Journal of Biochemistry 69, 243-245 (1971)

84. A.S.Gordon, F.J.Lombardi, H.R.Kaback: Solubilization and partial purification of amino acid- specific components of the D- lactate dehydrogenase- coupled amino acid- transport systems.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 69, 358-362 (1972)

85. B.P.Rosen: Basic amino acid transport in Escherichia coli. II. Purification and properties of an arginine- binding protein.
Journal of Biological Chemistry 248, 1211-1218 (1973)

86. H.Langendorf, G.Siebert, I.Lorenz, R.Hannover, R.Beyer: Kationenverteilung in Zellkern und Cytoplasma der Rattenleber.
Biochemische Zeitschrift 335, 273-284 (1961)

87. G.M.Tomkins, B.B.Levinson, J.D.Baxter, L.Dethlefson: Further evidence for posttranscriptional control of inducible tyrosine aminotransferase synthesis in cultured hepatoma cells.
Nature New Biology 239, 9-14 (1972)

88. I.B.Levithan, T.E.Webb: Effects of 5- Azacytidine on polyribosomes and on the control of tyrosine transaminase activity in rat liver.
Biochimica et Biophysica Acta 182, 491-500 (1969)

89. M.Kuwano, Y.Ikehara: Inhibition of messenger RNA formation in cultured fibroblasts: potentiation by amphotericin B.
Experimental Cell Research 82, 454-457 (1973)

90. G.Blobel, V.R.Potter: Studies on free and membrane- bound ribosomes in rat liver. II. Interaction of ribosomes and membranes.
Journal of Molecular Biology 26, 293-301 (1967)

91. F.H.Wilt: Polyadenylation of maternal RNA of sea urchin eggs after fertilization.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70, 2345-2349 (1973)

92. I.Slater, D.Gillespie, D.W.Slater: Cytoplasmic adenylation and processing of maternal RNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70, 406-411 (1973)

93. J.Diez, G.Brawerman: Elongation of the polyadenylate segment of messenger RNA in the cytoplasm of mammalian cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 71, 4091-4095 (1974)

94. M.Nemer, M.Graham, I.M.Dubroff: Co- existence of non- histone messenger RNA- species lacking and containing polyadenylic acid in sea urchin embryos.
Journal of Molecular Biology 89, 435-454 (1974)

95. F.T.Kenney, K.L.Lee: Further evidence against posttranscriptional control of inducible tyrosine aminotransferase synthesis in cultured hepatoma cells.
Nature New Biology 246, 208-210 (1973)

96. G.Schutz, L.Killewich, G.Chen, P.Feigelson: Control of the mRNA for hepatic tryptophan oxygenase during hormonal and substrate induction.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 72, 1017-1020 (1975)

97. R.D.Palmiter, R.T.Schimke: Regulation of protein synthesis in chick oviduct. III. Mechanism of ovalbumin "superinduction" by actinomycin D.
Journal of Biological Chemistry 248, 1502-1512 (1973)

Lebenslauf

Am 5. Februar 1949 wurde ich, Volker Ehrhardt, in Herzberg am Harz geboren. Meine Eltern sind Elfriede Ehrhardt, geb. Körbel und Ernst Ehrhardt.

Nach dem Besuch der Grundschule (1955-1959) und des Gymnasiums (1959-1967) in Herzberg bestand ich die Reifeprüfung (30.5.1967) des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges des Gymnasiums.

Mit dem Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Biologie und der Chemie an der Universität Göttingen. Ich schloß es nach einer unter Herrn Prof. Rensings Anleitung im I. Zoologischen Institut angefertigten experimentellen Arbeit ("Tagesrhythmik einzelner freier Aminosäuren in der Rattenleber") und einer mündlichen Prüfung mit dem Staatsexamen für das höhere Lehramt am 2. Juni 1973 erfolgreich ab.

Da die Untersuchung einiger interessanter Aspekte meiner Staatsexamensarbeit erfolgversprechend schien, führte ich meine Arbeit im Herbst 1973 fort und schloß sie im Herbst 1975 ab.

Am 1. September 1973 wurde mir ein Stipendium aufgrund des Graduiertenförderungsgesetzes gewährt, das ich bis zum 31. September 1974 in Anspruch nahm. Am 1. Oktober 1974 übertrug mir der Kurator der rator der Universität Göttingen die Verwaltung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beim I. Zoologischen Institut. Meine Berufung zum wissenschaftlichen Assistenten an diesem Institut erfolgte am 21. Februar 1975.